



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PALERMO

L'Univercittà



Ministero dell'Università e della  
Ricerca Scientifica e Tecnologica

*Università degli Studi di Palermo*

---

**Facoltà di Farmacia**  
**Dipartimento di Chimica e Tecnologie Farmaceutiche**

DOTTORATO DI RICERCA  
in  
*“Tecnologie delle Sostanze Biologicamente Attive”*  
XXII CICLO, A.A. 2007/2008

SSD CHIM/09

***PREPARAZIONE DI NUOVI SISTEMI POLIMERICI PER IL  
DRUG DELIVERY***

**Coordinatore:**

*Ch.mo Prof. Gaetano Giammona*

**Tesi di Dottorato di Ricerca di:**

*Daniela Triolo*

**Tutor:**

*Ch.ma Prof.ssa Giovanna Pitarresi*

# INDICE

|  |          |
|--|----------|
| <b>1. INTRODUZIONE</b>   | <b>1</b> |
| 1.1 Micelle polimeriche  | 6        |
| 1.1.1 Preparazione delle micelle e incorporazione dei farmaci              | 12       |
| 1.1.2 Eliminazione delle micelle   | 16       |
| 1.1.3 Stabilità delle micelle  | 16       |
| 1.1.4 Determinazione della concentrazione di<br>aggregazione critica (CAC) | 17       |
| 1.1.5 Caratterizzazione della struttura micellare                          | 18       |
| 1.1.6 Impiego delle micelle per il direccionamento dei farmaci             | 19       |
| 1.2 Idrogeli   | 24       |
| 1.2.1 Preparazione degli idrogeli  | 25       |
| 1.2.2 Caratterizzazione chimico-fisica degli idrogeli                      | 29       |
| 1.2.2.1 <i>Grado di rigonfiamento (swelling)</i>                           | 29       |
| 1.2.2.2 <i>Porosità del network</i>  | 31       |
| 1.2.3 Incorporazione di un principio attivo in un idrogel                  | 31       |
| 1.2.4 Meccanismi di rilascio del farmaco                                   | 33       |
| 1.2.5 Sistemi sensibili a modificazioni ambientali                         | 34       |
| 1.2.5.1 <i>Idrogeli pH sensibili</i>                                       | 35       |
| 1.2.5.2 <i>Idrogeli termosensibili</i>                                     | 36       |
| 1.2.5.3 <i>Idrogeli pH- e termo- sensibili</i>                             | 41       |
| 1.2.5.4 <i>Idrogeli responsivi a stimoli biologici</i>                     | 42       |
| 1.3 Colon drug delivery  | 45       |
| 1.3.1 Profarmaci macromolecolari   | 49       |
| 1.3.2 Idrogeli pH-sensibili  | 49       |
| 1.3.3 Sistemi di rilascio tempo-dipendenti                                 | 50       |
| 1.3.4 Sistemi di rilascio degradabili dalla microflora batterica           | 51       |
| 1.3.5 Polimeri utilizzati per i <i>Colon Drug Delivery Systems</i>         | 52       |

|            |  |     |
|------------|--|-----|
| 1.3.5.1    | <i>Polisaccaridi naturali</i>  | 52  |
| 1.3.5.2    | <i>Polimeri sintetici</i>  | 60  |
| <b>2.</b>  | <b>SCOPO DELLA TESI</b>  | 62  |
| <b>3.</b>  | <b>RISULTATI E DISCUSSIONE</b>   | 70  |
| <b>3.1</b> | <b>SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DI<br/>COPOLIMERI FLUORURATI A BASE DI PHEA<br/>PER LA VEICOLAZIONE DI FARMACI LIPOFILI</b> | 70  |
| 3.1.1      | Sintesi e caratterizzazione del copolimero PHEA-PEG <sub>2000</sub>  | 70  |
| 3.1.2      | Sintesi e caratterizzazione del copolimero<br>PHEA-PEG <sub>2000</sub> - EDA   | 73  |
| 3.1.3      | Sintesi e caratterizzazione dei copolimeri<br>PHEA-PEG <sub>2000</sub> -EDA-PPOX e PHEA-PEG <sub>2000</sub> -EDA-CPOX      | 77  |
| 3.1.3.1    | <i>Copolimero PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX</i>   | 77  |
| 3.1.3.2    | <i>Copolimero PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX</i>   | 83  |
| 3.1.4      | Analisi SEC  | 88  |
| 3.1.5      | Determinazione della concentrazione di aggregazione<br>critica   | 91  |
| 3.1.6      | Analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM)   | 93  |
| 3.1.7      | Valutazione della capacità degli aggregati<br>polimerici di solubilizzare farmaci lipofili                                 | 95  |
| 3.1.7.1    | <i>La flutamide e il carcinoma prostatico</i>  | 95  |
| 3.1.8      | Studi di solubilizzazione della flutamide  | 98  |
| 3.1.9      | Studi di stabilità delle micelle   | 99  |
| 3.1.10     | Studi di proliferazione cellulare <i>in vitro</i>  | 101 |
| 3.1.11     | Conclusioni  | 104 |

### **3.2 SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DI IDROGELI pH-SENSIBILI A BASE DI INULINA**

|   |     |
|---|-----|
| 3.2.1 Sintesi e caratterizzazione dell'INUMASA  | 105 |
| 3.2.2 Sintesi e caratterizzazione del PHM   | 107 |
| 3.2.3 Preparazione degli idrogeli<br>INUMASA/PHM o INUMASA/PHM/PEGDM<br>mediante irradiazione UV e loro caratterizzazione | 109 |
| 3.2.4 Studi di <i>swelling</i>  | 111 |
| 3.2.5 Studi di degradazione enzimatica  | 113 |
| 3.2.6 Compatibilità cellulare degli idrogel<br>INUMASA/PHM e INUMASA/PHM/PEGDM  | 114 |
| 3.2.7 Effetti dell'irraggiamento sulle IgG e loro<br>caricamento negli idrogeli   | 116 |
| 3.2.8 Studi di rilascio delle IgG dagli idrogeli<br>INUMASA/PHM e INUMASA/PHM/PEGDM                                       | 118 |
| 3.2.9 Conclusioni   | 120 |

### **3.3 SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DI IDROGELI A BASE DEL DERIVATO DIVINILSULFONICO DELL'INULINA PER LA VEICOLAZIONE DI FARMACI LIPOFILI**

|   |     |
|---|-----|
| 3.3.1 Caratterizzazione dell'INUDV  | 121 |
| 3.3.2 Preparazione degli idrogeli INUDV/PEGBa<br>e loro caratterizzazione | 123 |
| 3.3.3 Studi di <i>swelling</i> sulla matrice vuota                        | 127 |
| 3.3.4 Studi di degradazione chimica ed enzimatica<br>degli idrogeli       | 128 |
| 3.3.5 Compatibilità cellulare degli idrogeli INUDV/PEGBa                  | 129 |

|  |         |
|--|---------|
| 3.3.6 Studi di interazione con la mucina   | 132     |
| 3.3.7 Impiego dell'idrogel INUDV/PEGBa-C come<br><i>drug delivery system</i>   | 135     |
| 3.3.7.1 Caricamento del farmaco nell'idrogel   | 135     |
| 3.3.7.2 Analisi dimensionale dei microgeli   | 136     |
| 3.3.7.3 Analisi ai Raggi X   | 136     |
| 3.3.7.4 Studi di swelling sull'idrogel contenente flutamide  | 137     |
| 3.3.7.5 Studi di rilascio della flutamide  | 139     |
| 3.3.7.6 Analisi del meccanismo di rilascio del<br>farmaco dalla matrice  | 140     |
| 3.3.8 Conclusioni  | 144     |
| <br><b>4. PARTE SPERIMENTALE</b>   | <br>146 |
| <b>4.1 SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DI COPOLIMERI<br/>FLUORURATI A BASE DI PHEA PER LA VEICOLAZIONE DI<br/>FARMACI LIPOFILI</b>   | <br>146 |
| 4.1.1 Materiali  | 146     |
| 4.1.2 Apparecchiature  | 147     |
| 4.1.3 Sintesi del PHEA   | 148     |
| 4.1.4 Sintesi e caratterizzazione del PHEA-PEG <sub>2000</sub>   | 148     |
| 4.1.5 Sintesi e caratterizzazione del PHEA-PEG <sub>2000</sub> -EDA  | 149     |
| 4.1.6 Sintesi e caratterizzazione del<br>PHEA-PEG <sub>2000</sub> -EDA-PPOX  | 150     |
| 4.1.7 Sintesi e caratterizzazione del<br>PHEA-PEG <sub>2000</sub> -EDA-CPOX  | 151     |
| 4.1.8 Determinazione UV del contenuto in ossadiazolo<br>fluorurato nei copolimeri PHEA-PEG <sub>2000</sub> -EDA-PPOX <sub>1-3</sub><br>e PHEA-PEG <sub>2000</sub> -EDA-CPOX <sub>1-3</sub> | 152     |

|        |  |     |
|--------|--|-----|
| 4.1.9  | Determinazione della concentrazione di<br>aggregazione critica | 152 |
| 4.1.10 | Microscopia elettronica a scansione (SEM)                      | 153 |
| 4.1.11 | Preparazione delle micelle cariche di flutamide                | 154 |
| 4.1.12 | Studi di solubilità della flutamide                            | 154 |
| 4.1.13 | Determinazione del contenuto di farmaco                        | 155 |
| 4.1.14 | Studi di stabilità <i>in vitro</i>                             | 155 |
| 4.1.15 | Coltura cellulare  | 157 |
| 4.1.16 | Determinazione della proliferazione cellulare                  | 158 |
| 4.1.17 | Analisi statistica   | 158 |

## **4.2 SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DI IDROGELI pH-SENSIBILI A BASE DI INULINA**

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 4.2.1 | Materiali  | 159 |
| 4.2.2 | Apparecchiature  | 159 |
| 4.2.3 | Derivatizzazione dell'inulina con anidride metacrilica<br>e anidride succinica (INUMASA)                           | 160 |
| 4.2.4 | Derivatizzazione dell' $\alpha,\beta$ -poli[N-(2-idrossietil)-D,L-<br>aspartammide] con anidride metacrilica (PHM) | 162 |
| 4.2.5 | Preparazione degli idrogeli INUMASA/PHM o<br>INUMASA/PHM/PEGDM mediante irradiazione UV                            | 163 |
| 4.2.6 | Studi di rigonfiamento degli idrogeli INUMASA/PHM o<br>INUMASA/PHM/PEGDM   | 163 |
| 4.2.7 | Studi di degradazione in vitro degli idrogeli<br>INUMASA/PHM o INUMASA/PHM/PEGDM<br>mediante inulinasi             | 164 |
| 4.2.8 | Coltura cellulare  | 165 |
| 4.2.9 | Studi di compatibilità cellulare <i>in vitro</i>   | 165 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.2.10 Effetto dell'irradiazione UV sulle IgG                                       | 166 |
| 4.2.11 Caricamento delle IgG negli idrogel INUMASA/PHM<br>o INUMASA/PHM/PEGDM       | 167 |
| 4.2.12 Studi di rilascio delle IgG dagli idrogel INUMASA/PHM<br>o INUMASA/PHM/PEGDM | 167 |
| 4.2.13 Analisi statistiche  | 168 |

### **4.3 SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DI IDROGELI A BASE DEL DERIVATO DIVINILSULFONICO DELL'INULINA PER LA VEICOLAZIONE DI FARMACI LIPOFILI**

|  |     |
|--|-----|
| 4.3.1 Materiali  | 169 |
| 4.3.2 Apparecchiature  | 169 |
| 4.3.3 Sintesi del derivato INUDV   | 171 |
| 4.3.4 Caratterizzazione del derivato INUDV   | 172 |
| 4.3.5 Preparazione degli idrogel INUDV/PEGBa                                       | 173 |
| 4.3.6 Studi di <i>swelling</i>   | 174 |
| 4.3.7 Studi di idrolisi chimica in fluido gastrico simulato                        | 174 |
| 4.3.8 Studi di degradazione enzimatica con inulinasi                               | 175 |
| 4.3.9 Coltura cellulare  | 175 |
| 4.3.9.1 Studi di compatibilità cellulare <i>in vitro</i>                           | 176 |
| 4.3.10 Studi di mucoadesione   | 177 |
| 4.3.11 Caricamento dell'idrogel INUDV/PEGBa-C con flutamide mediante impregnazione | 178 |
| 4.3.12 Determinazione della quantità di farmaco incorporata nell'idrogel           | 178 |
| 4.3.13 Studi di rilascio   | 179 |

|  |            |
|--|------------|
| 4.3.14 Studi di dissoluzione della compressa e<br>del farmaco libero | 179        |
| 4.3.15 Analisi statistiche   | 180        |
| <b>5. BIBLIOGRAFIA</b>   | <b>181</b> |



## 1. INTRODUZIONE

La terapia farmacologica convenzionale è caratterizzata da alcuni inconvenienti che potrebbero comportare una diminuzione del successo della risposta terapeutica. Si possono verificare infatti fenomeni di degradazione e di metabolismo del farmaco che impediscono il raggiungimento di livelli ottimali di biodisponibilità obbligando pertanto a ripetute somministrazioni giornaliere; fluttuazioni della concentrazione del principio attivo sul sito d'azione al di fuori dei *range* di concentrazione ottimale entro il quale si esplica la massima azione farmacologica, con conseguenti effetti indesiderati o scarsa risposta terapeutica ed infine, il profilo cinetico di rilascio del farmaco dalla forma di dosaggio non sempre permette il raggiungimento della concentrazione ematica terapeuticamente efficace al momento utile, in quanto i due eventi non sempre sono tra essi sincronizzati. Al fine di superare questi inconvenienti, nel campo della ricerca tecnologica-farmaceutica si è sviluppata un'importante area di ricerca, il *drug delivery*, che si occupa di modificare la cinetica di rilascio del principio attivo prolungandone la permanenza in circolo e di potenziare l'azione di tutti quei farmaci il cui utilizzo è limitato dal loro profilo biofarmaceutico inadeguato, caratterizzato da mancanza di solubilità e di stabilità nei fluidi biologici, incapacità di attraversamento degli epiteli (es. farmaci proteici e/o peptidici) e delle membrane cellulari (es. farmaci idrofili diretti verso il sistema nervoso centrale).

Il *drug delivery* studia la realizzazione di sistemi che permettono la somministrazione di nuovi agenti terapeutici, e l'ottimizzazione di

prestazioni di farmaci che sono già sul mercato, massimizzando la loro attività terapeutica e rendendo minimi i loro effetti collaterali. Questi sistemi prendono il nome di *Drug Delivery Systems (DDS)* attraverso i quali è possibile minimizzare la degradazione e la perdita di principio attivo, aumentarne la specificità, l'efficacia e la biodisponibilità e realizzare un rilascio protratto e controllato di esso.

Inoltre, per ottenere un controllo della distribuzione del farmaco nell'organismo di tipo temporale e spaziale e della cinetica di cessione del principio attivo, i sistemi di rilascio possono essere resi *sito-specifici*, ottimizzando in questo modo l'indice terapeutico del principio attivo e focalizzando la sua attività farmacologica direttamente al sito o organo bersaglio, diminuendo così l'incidenza degli effetti indesiderati nei tessuti non bersaglio [Li S. and Vert M., 1999].

Il successo del *rilascio direzionato del farmaco (drug targeting)* richiede numerosi studi che tengano in considerazione le proprietà farmacodinamiche e farmacocinetiche del farmaco in studio, la natura delle membrane cellulari, il sito patologico target del farmaco, la distribuzione e la presenza dei recettori e degli enzimi responsabili del metabolismo del principio attivo, la sua emivita, la biodisponibilità e il flusso sanguigno locale.

Affinchè il *drug targeting* possa essere realizzato è necessario includere i farmaci in *carrier* opportuni che possano veicarli al sito d'azione specifico.

Dal punto di vista farmacocinetico un *carrier* ideale dovrebbe minimizzare l'eliminazione e la prematura degradazione del farmaco, prevenire gli effetti collaterali dannosi, aumentarne la biodisponibilità

e la frazione accumulata in una determinata zona dell'organismo. Inoltre, la somministrazione di un farmaco tramite uno specifico *carrier* potrebbe determinare un assorbimento ritardato, una ristretta biodistribuzione, un ritardo nella *clearance* ed una diminuzione della velocità di metabolismo del farmaco [Allen T.M. et al., 1995; Hwang K.J., 1987], pertanto, l'importanza della scelta del *carrier* dipende dal fatto che esso andrà ad influenzare l'attività del farmaco trasportato.

Tra i diversi *carrier* proposti e/o utilizzati come DDS per la somministrazione di principi attivi, particolare interesse hanno suscitato i profarmaci macromolecolari a base di polimeri solubili, i sistemi microparticellari (microsfere e microcapsule) costituiti da polimeri sia naturali che sintetici, i liposomi e le micelle polimeriche [Muller R. H., 1991; Prokop A. and Davidson J.A., 2008].

Questi DDS possono essere realizzati in modo da essere degradati lentamente nell'organismo (nel caso di polimeri biodegradabili), rispondere a determinati stimoli quali variazioni di pH o di temperatura, o permettere un rilascio specifico in un particolare tessuto mediante la coniugazione con molecole *targeting* (ad esempio anticorpi), sfruttando il legame di queste a specifici recettori cellulari caratteristici dell'area di interesse [Muller R.H., 1991]. Infine, i *carrier* possono essere a lunga circolazione per consentire il mantenimento del livello terapeutico richiesto nel sangue per un esteso intervallo di tempo [Lasic D.D. and Martin F., 1995; Torchilin and Trubetskoy, 1995].

Tra i materiali ampiamente utilizzati per la formazione di DDS vi sono i *polimeri*.

I polimeri, macromolecole costituite da unità monomeriche ripetitive, possono essere di origine naturale, semisintetica o sintetica, e sono potenzialmente altamente versatili poiché, grazie alle loro diverse caratteristiche chimico-fisiche, sono in grado di soddisfare importanti criteri quali eventuale biodegradabilità, biocompatibilità e riproducibilità di processo, permettendo in tal modo di modulare opportunamente le proprietà dei DDS.

I polimeri (e i loro eventuali prodotti di degradazione) da utilizzare per un DDS, devono essere chimicamente inerti, non tossici, non cancerogeni, non teratogeni, immunocompatibili, non allergenici, biocompatibili e se necessario biodegradabili e sterilizzabili.

La scelta del polimero da impiegare per la progettazione del DDS e del tipo di modificazione chimica della struttura polimerica tramite opportuni gruppi funzionali, è un compito impegnativo in quanto andrà ad influenzare le strutture finali e richiede una profonda conoscenza delle caratteristiche chimiche, fisiche, meccaniche, biologiche e biofarmaceutiche delle strutture macromolecolari, quali peso molecolare, solubilità, idrofobicità e idrofilia, degradabilità, durezza, fragilità, plasticità, cristallinità, viscosità, carica superficiale e reattività chimica, bioadesività. Tutte queste proprietà sono dipendenti dalla natura chimica dei monomeri e dalla loro percentuale relativa nella macromolecola, dalla loro disposizione spaziale e quindi dalla conformazione del polimero stesso.

La composizione chimica del polimero può influenzare molte proprietà chimico-fisiche della struttura finale, come ad esempio l'idrofilia, la morfologia, la struttura, le dimensioni dei pori e l'intensità di interazione farmaco-polimero (solubilità del farmaco nel

polimero) che a loro volta influenzeranno la *performance* del sistema di rilascio.

Anche la presenza di gruppi carichi lungo il *backbone*, sui gruppi laterali, o sui gruppi terminali delle catene polimeriche può variare l'interazione polimero-polimero e polimero-farmaco.

Sia i polimeri sintetici che naturali sono ampiamente utilizzati come materiali per la realizzazione di DDS. Tra i polimeri sintetici vi sono i poliesteri (acido polilattico (PLA), acido polilattico-poliglicolico (PLGA), acido poliglicolico (PLG)), le poliammidi (poliamminoacidi, polipeptidi), le polianidridi, i poliortoesteri, i polifosfazeni e i polifosfoesteri. Tra i polimeri naturali, ricordiamo i polisaccaridi (destrano, chitosano, alginato, amido, inulina e acido ialuronico), i polipeptidi e le proteine (collagene, gelatina, albumina di siero bovino (BSA), albumina di siero umano (HSA)).

La grande varietà di polimeri che si possono utilizzare per il *drug delivery* rende possibile la realizzazione di diversi sistemi polimerici, tra cui le micelle polimeriche e gli idrogeli che sono stati oggetto di studio nella presente tesi di Dottorato di Ricerca.

## 1.1 MICELLE POLIMERICHE

Le micelle polimeriche si ottengono dall'associazione spontanea dei copolimeri anfifilici in soluzione acquosa in seguito al raggiungimento di una certa concentrazione (detta concentrazione di aggregazione critica, CAC) e ad una data temperatura (temperatura critica di micellizzazione, CMT). Al di sotto di questi valori le macromolecole esistono come unimeri e al di sopra coesistono come aggregati micellari in equilibrio con le singole unità [Torchilin, 2007].

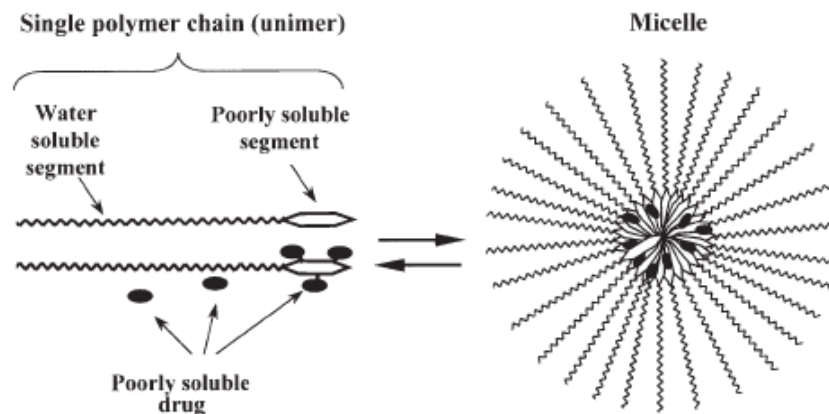
La *driving-force* che conduce all'associazione dei copolimeri anfifilici in micelle è la diminuzione di energia libera del sistema dovuta alla sottrazione dei gruppi idrofobici dall'ambiente acquoso circostante, con la formazione di un *core* micellare, e alla disposizione dei blocchi idrofili verso l'ambiente acquoso i quali saranno stabilizzati dalla formazione di interazioni tra la porzione idrofila del polimero ed il solvente. Un ulteriore guadagno di energia si ricava dal ripristino dei legami idrogeno tra le molecole di acqua e dall'instaurarsi di forze di Van der Waals tra i gruppi idrofobi all'interno del sistema [Astareva I. et al., 1993; Price C., 1983].

Le porzioni idrofobiche delle macromolecole anfifiliche formano il *core* di una micella, che si comporta come *reservoir* per il principio attivo insolubile, proteggendolo dal contatto con l'ambiente acquoso, invece le porzioni idrofile formano la corona di una micella, la *shell*, affine all'acqua che permette di veicolare in ambiente acquoso il composto idrofobico in essa solubilizzato. La *shell* è inoltre responsabile della stabilizzazione della micella e delle interazioni con le proteine plasmatiche e con le membrane cellulari.

La biodistribuzione delle micelle, la loro farmacocinetica, la biocompatibilità, l'adsorbimento di macromolecole sulla loro superficie, l'adesione alle superfici biologiche e la possibilità di essere veicolate verso siti *target* sono influenzate da proprietà delle micelle stesse, quali l'idrofilicità, la carica, la lunghezza e la densità superficiale dei blocchi idrofili.

Il *core* dovrebbe avere alta capacità di caricamento del farmaco, e garantirne un profilo di rilascio controllato, oltre ad avere una buona compatibilità con il farmaco stesso.

In figura 1 è presentato uno schema di formazione di una micella polimerica e la sua capacità di caricamento di un farmaco poco solubile in acqua, sia mediante legame covalente che tramite interazione fisica.



**Figura 1.** Formazione di una micella polimerica da unimeri anfifilici e incorporazione del farmaco nel *core* micellare mediante legame covalente ai residui idrofobici dell'unimero e mediante incorporazione non covalente nel *core* idrofobico della micella

Un sistema micellare ideale dovrebbe formarsi spontaneamente ed incorporare al suo interno molecole di principio attivo per poi rilasciarlo in forma libera in seguito al contatto col sito bersaglio; avere dimensioni di 10-100 nm affinché possa essere in grado di giungere ai tessuti in seguito all'attraversamento delle membrane; essere stabile *in vivo* per un tempo sufficientemente lungo; non causare effetti indesiderati; essere formato da componenti che possano essere eliminati dall'organismo con facilità una volta completata la loro funzione di veicolo [Kabanov *et al.*, 1998] e avere un peso molecolare sufficientemente basso per essere escreto per via renale [Seymour L.W. *et al.*, 1987].

Date le piccole dimensioni, e grazie all'aumentata permeabilità delle barriere fisiologiche in corso di un evento patogeno, le micelle polimeriche sono in grado di attraversare le barriere fisiologiche, inducendo sostanziali cambiamenti nella biodistribuzione del farmaco. Come già accennato, la formazione delle micelle è funzione della concentrazione dei polimeri in un determinato mezzo. A basse concentrazioni, esse esistono solamente come singole catene. All'aumentare della concentrazione e fino al raggiungimento della concentrazione di aggregazione critica (CAC), le catene polimeriche cominciano ad associarsi e a formare le micelle. Al di sotto e intorno al valore di CAC, una grande quantità di solvente si troverà nel *core* micellare e le micelle saranno definite come aggregati aventi grandi dimensioni, mentre a valori più alti della CAC, l'equilibrio si sposterà a favore della formazione delle micelle le quali adotteranno uno stato di bassa energia e il solvente rimanente sarà gradualmente rilasciato



dal *core* idrofobico diminuendo così le dimensioni degli aggregati [Gao Z. and Eisenberg A., 1993].

Minore è il valore di CAC di un dato polimero anfifilico, più stabili saranno le micelle anche a basse concentrazioni del polimero nel mezzo. Questo è un dato importante dal punto di vista applicativo, in quanto, quando somministrate *in vivo*, esse si troveranno in contatto con un elevato volume ematico e, solo le micelle con un basso valore di CAC risulteranno ancora presenti, mentre gli aggregati con elevati valori di CAC in seguito alla diluizione si dissocieranno facilmente negli unimeri di partenza e il loro contenuto precipiterà nel sangue. Per questo motivo gli aggregati con alto valore di CAC non sono adatti all'utilizzo come DDS.

Molte micelle sono caratterizzate da copolimeri portanti catene di poliossietilenglicole (PEG) con peso molecolare compreso tra 1 e 15 kDa, rappresentanti la porzione idrofila dell'aggregato e pertanto formano la *shell* idrofila.

La scelta del PEG si fonda sulle sue caratteristiche di biocompatibilità, elevata solubilità nei mezzi acquosi, elevata idratatazione che lo rende capace di funzionare come un efficace protettore sterico per vari vettori particellari quali micelle, liposomi, nanoparticelle.

Il PEG è atossico, non biodegradabile e non immunogenico, sebbene circa lo 0.2% della popolazione sviluppi anticorpi anti-PEG, i quali comunque non portano ad effetti collaterali tali da impedirne l'impiego farmaceutico [Dreborg S. and Akerblom E. B., 1990]. Nonostante non sia biodegradabile, il PEG può essere eliminato dall'organismo mediante l'emuntorio epatico e renale senza subire modifiche strutturali; la *clearance*, tuttavia, dipende dal peso molecolare del

polimero stesso: al di sotto dei 20 kDa i PEG vengono liberamente filtrati a livello glomerulare, mentre per pesi molecolari maggiori la rimozione dal circolo è più lenta [Yamaoka T. et al., 1994]

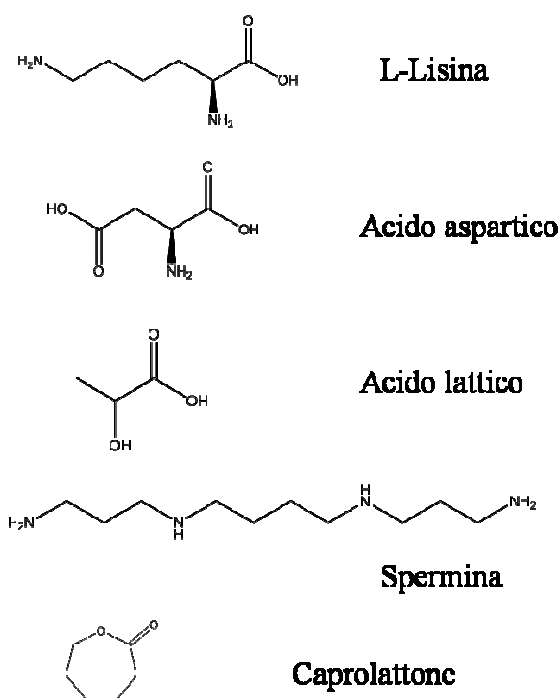
In virtù di tali caratteristiche e grazie anche alla bassa tossicità, il PEG è stato approvato dall'*European Agency for the Evaluation of Medicinal Products* (EMA) e dalla *Food and Drug Administration* (FDA). Inoltre, il polietilenglicole possiede interessanti proprietà *stealth* che permettono una lunga permanenza nel circolo sanguigno dei sistemi colloidali (micelle, nanoparticelle, liposomi), in quanto viene prevenuto l'adsorbimento delle opsonine impedendo, quindi, l'*uptake* da parte delle cellule fagocitiche da parte del Sistema Reticolo Endoteliale (RES).

La repulsione delle opsonine è consentita dalla configurazione estesa che acquistano le catene di PEG in soluzione, questo fa sì che quando le opsonine vengono attratte tramite interazioni deboli e di van der Waals, vadano a comprimere le lunghe catene di PEG. Questa compressione forza le catene di PEG in una conformazione ad alta energia che genera forze di repulsione maggiori rispetto a quelle di attrazione.

Al fine di ottenere un'effettiva repulsione delle opsonine, lo strato superficiale deve avere uno spessore opportuno che sarà funzione del peso molecolare, della densità delle catene superficiali e della conformazione del PEG.

Per ottenere sistemi con caratteristiche *stealth*, numerose ricerche indicano che il peso molecolare delle catene di PEG deve essere pari o superiore ai 2000 Da.

Le porzioni lipofile sono possono essere costituite da diversi polimeri ottenuti dalla polimerizzazione della L-lisina [Katayose S. and Kataoka K., 1998; Trubetskoy V.S. et al., 1997], acido aspartico [Yokoyama M. et al., 1990; Harada A. and Kataoka K., 1998], caprolattone [Kim S.Y. et al., 1998; Allen C. et al., 1998], D,L- acido lattico [Ramaswamy M. et al., 1997; Hagan S.A. et al., 1996], spermina [Kabanov A.V., 1998] (vedi figura 2). In alcuni casi possono essere usati per la formazione del *core* idrofobico residui fosfolipidici corti ma estremamente idrofobici data la presenza di due catene di gruppi acilici grassi [Trubetskoy V.S. and Torchilin V.P., 1995], o catene idrocarburiche con 12-18 atomi di carbonio [Lavasanifar A. et al., 2001; Cavallaro G. et al., 2003; Cavallaro G. et al., 2004 (B)].



**Figura 2.** Strutture di alcuni polimeri utilizzati per la formazione del *core* idrofobico di micelle polimeriche

### 1.1.1 Preparazione delle micelle e incorporazione dei farmaci

Le micelle polimeriche possono essere preparate secondo diversi metodi, i due più utilizzati sono il *metodo della dissoluzione diretta* e il *metodo della dialisi* [Allen C. et al, 1999].

Il primo metodo viene usato quando i copolimeri sono solubili in acqua, e consiste nella dispersione del copolimero, in concentrazione superiore al valore della CAC, in un mezzo acquoso a temperatura ambiente o maggiore. In alcuni casi, il farmaco viene miscelato con il polimero prima della sua dissoluzione in acqua, ottenendo una preliminare interazione tra polimero e farmaco [Cavallaro G. et al., 2003; Cavallaro G. et al., 2004 (B)].

Il metodo della dialisi, invece, permette di formare micelle a partire da polimeri insolubili nei mezzi acquosi, ed implica l'utilizzo di solventi organici miscibili con l'acqua (dimetilsofossido, dimetilformammide, tetraidrofurano) per la dissoluzione del copolimero che verranno poi eliminati mediante dialisi contro acqua che darà luogo ad una lenta sostituzione della fase organica con quella acquosa inducendo così la micellizzazione del sistema.

L'incorporazione di farmaci apolari all'interno delle micelle è resa possibile dall'orientamento caratteristico *core-shell* assunto dai copolimeri. Durante la formazione delle micelle e quindi durante l'associazione della porzione idrofobica del copolimero, man mano che l'acqua viene spinta all'esterno del sistema, il principio attivo interagisce con il *core* idrofobico, secondo un processo spontaneo in quanto energeticamente favorito. La quantità di farmaco che viene incorporata nelle micelle è funzione della sua affinità nei confronti della porzione lipofila (motivo per cui è necessario selezionare

l'opportuna porzione lipofila polimerica) e delle caratteristiche del farmaco stesso, quali polarità, lipofilia ed eventuale carica. Essa è inoltre funzione delle dimensioni della porzione idrofila e di quella idrofoba del sistema: tanto più grandi sono le dimensioni del *core* tanto maggiore sarà la quantità di farmaco incorporata e di conseguenza, più grandi saranno le dimensioni micellari [Hagan S.A. *et al.*, 1996]. Un aumento nella lunghezza della catena idrofila determina un aumento del valore della CAC, di conseguenza, quando un copolimero di questo tipo viene posto in soluzione acquosa, solo una parte si assocerà in micella e pertanto potrà essere incorporata solo una minore quantità di farmaco.

Secondo quanto riportato in letteratura l'efficienza di incapsulazione di farmaci idrofobici dovrebbe essere intorno al 5-25 % p/p [Allen C. *et al.*, 1999].

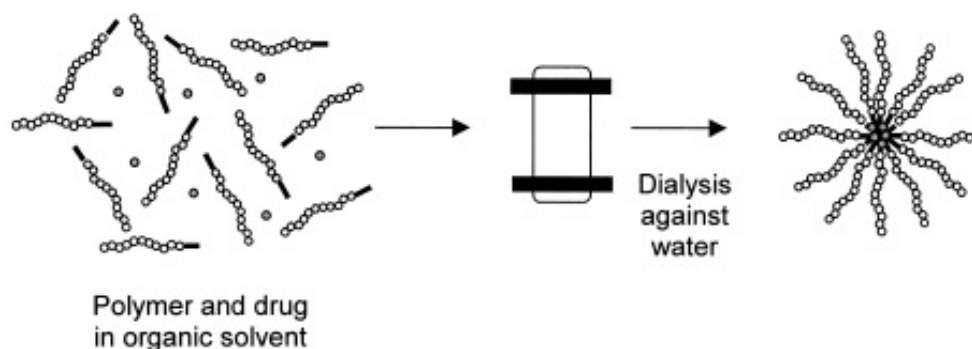
L'incorporazione del farmaco nel *core* micellare coinvolge l'instaurarsi di forze coesive come le interazioni idrofobiche, elettrostatiche,  $\pi$ - $\pi^*$  e legami ad idrogeno, ma essendo poco solubili, molti farmaci sono incapsulati mediante interazioni idrofobiche [Nah J.W. *et al.*, 1998; Wang Y. *et al.*, 2007].

I farmaci insolubili possono essere incorporati nelle micelle mediante coniugazione chimica alla macromolecola [Nobuhiro N. *et al.*, 2003] o mediante interazione di tipo fisico con le porzioni polimeriche idrofobiche [Chan J.M. *et al.*, 2009].

La coniugazione chimica implica la formazione di un legame covalente fra gruppi specifici del farmaco e la porzione idrofobica del *core* polimerico. In questo modo si potrebbero formare legami resistenti all'idrolisi enzimatica a causa di impedimenti sterici per cui

spesso si rende necessaria l'introduzione di *spacer* nella struttura micellare. L'incorporazione del farmaco avverrà simultaneamente con la formazione del sistema e il suo rilascio sarà controllato dalla degradazione *in bulk* del sistema o dall'erosione superficiale, in seguito al processo di penetrazione dell'acqua nel *core* lipofilo, dalla dissociazione micellare e dalla rottura del legame farmaco-copolimero.

L'incorporazione fisica del farmaco è generalmente eseguita col metodo della dialisi (figura 3).



**Figura 3.** Incorporazione del farmaco mediante il metodo della dialisi

Questo metodo viene adottato quando sia il polimero che il farmaco sono poco solubili in acqua. Esso consiste nel disciogliere il copolimero e il farmaco in un comune solvente organico miscibile con l'acqua, come dimetilsolfossido, dimetilformammide, acetonitrile, tetraidrofurano, etc.; in seguito la soluzione ottenuta viene posta in dialisi contro acqua.

Così, mentre il solvente organico è sostituito da quello acquoso, si assiste all'associazione della porzione idrofobica del copolimero con conseguente incorporazione del farmaco lipofilo. La totale

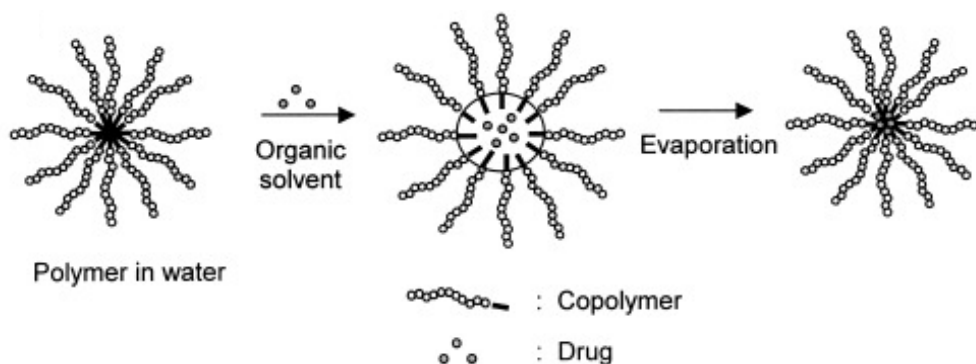
eliminazione del solvente organico viene effettuata mediante dialisi esaustiva contro un elevato volume di acqua.

Il rilascio del farmaco incorporato fisicamente nel sistema, dipenderà dalla sua velocità di diffusione dal *core* micellare e dalla disaggregazione delle micelle.

Altri fattori che influenzano il rilascio del farmaco sono il coefficiente di partizione, la quantità di farmaco incorporato, la lunghezza della parte del copolimero che forma il *core*.

Se il solvente organico non è miscibile con l'acqua, il farmaco può essere incorporato mediante la formazione di una *emulsione olio in acqua* (figura 4). Questo metodo consiste nel preparare una soluzione acquosa del copolimero alla quale viene lentamente aggiunta una soluzione di farmaco solubilizzato in un solvente organico volatile e immiscibile con l'acqua (ad es. cloroformio e etanolo). Il sistema viene tenuto sotto vigorosa agitazione per formare un'emulsione con una fase interna organica ed una fase esterna acquosa, in cui il polimero si riarrangia per formare la micella.

In seguito all'evaporazione del solvente volatile in cui è solubilizzato il farmaco, quest'ultimo verrà via via incorporato nella porzione idrofobica.



**Figura 4.** Incorporazione del farmaco nella micella mediante il metodo dell'emulsione o/w

### 1.1.2 Eliminazione delle micelle

In seguito all'avvenuto rilascio del farmaco, le micelle polimeriche devono essere eliminate dal corpo. Molti copolimeri utilizzati per la loro preparazione sono biodegradabili e biocompatibili in modo che possano essere facilmente rimossi dal corpo dopo uno specifico periodo di tempo senza indurre effetti collaterali.

Poichè gli aggregati micellari, per poter rilasciare il farmaco allo specifico sito di azione, devono rimanere in circolo per un periodo sufficiente di tempo, devono avere un peso molecolare maggiore rispetto al *cut-off* limite delle fenestrature dei vasi attraverso le quali potrebbero essere eliminati tramite filtrazione glomerulare. Pertanto, la loro eliminazione avverrà mediante dissociazione di essi nei copolimeri anfifilici di cui sono composti aventi un peso molecolare inferiore al *cut-off* limite per la filtrazione glomerulare, e sotto tale forma essi potranno essere eliminati dal corpo.

### 1.1.3 Stabilità delle micelle

Distinguiamo una *stabilità termodinamica* e una *stabilità cinetica* delle micelle. La prima è correlata al valore di CAC, al di sotto della quale l'equilibrio è spostato verso la formazione degli unimeri. La seconda, invece, fornisce informazioni sul tempo reale della dissociazione delle micelle in unimeri, dato che, anche in seguito a diluizioni a concentrazioni inferiori alla CAC, le micelle preformate possono esistere persino per lungo tempo e svolgere la propria funzione di *carrier* di farmaci.

La stabilità cinetica o velocità di dissociazione delle micelle ad una concentrazione inferiore alla CAC, dipende da molti fattori che



includono lo stato fisico del *core* micellare, il contenuto di solvente all'interno del *core*, la dimensione dei blocchi idrofobici e il rapporto tra porzioni idrofobiche e porzioni idrofile (all'aumentare della lunghezza del blocco idrofobo rispetto a quello idrofilo, si ha una riduzione dei valori di CAC e un aumento della stabilità micellare) [Tian M., et al., 1993; Wang Y. et al., 1995; Creutz S. Et al., 1998].

#### **1.1.4 Determinazione della concentrazione di aggregazione critica (CAC)**

Una metodica ampiamente utilizzata per la determinazione della CAC consiste nell'utilizzo di sonde fluorescenti, fra le quali il pirene è il più usato [Astareva I. et al., 1993; Wilhelm M. et al., 1991].

Il pirene è un idrocarburo aromatico altamente idrofobico e sensibile alla polarità dell'ambiente circostante [Kalyanasundaram K. and Thomas J.K., 1977].

Per valori inferiori alla CAC, il pirene è disperso in acqua, mezzo altamente polare, trovandosi pertanto in uno stato energeticamente non favorito. Man mano che si formano le micelle, il pirene va solubilizzandosi nel *core* micellare idrofobico per il quale mostra più alta affinità passando così in uno stato energeticamente favorito. Quando il pirene diffonde dall'ambiente polare (acqua) a quello apolare (*core* micellare) e quindi in seguito a cambiamenti nella micropolarità dell'ambiente circostante, si verificano variazioni nelle proprietà di fluorescenza come il cambiamento nella struttura vibrazionale nello spettro di emissione ed un *red shift* nello spettro di eccitazione del pirene.

La CAC può essere determinata riportando su un grafico il rapporto delle intensità  $I_3/I_1$  derivante dallo spettro di emissione del pirene o il rapporto delle intensità  $I_{336}/I_{333}$  derivante dallo spettro di eccitazione del pirene contro il logaritmo delle concentrazioni di copolimero in fase acquosa usate nell'esperimento. Si ottiene una curva sigmoideale, in cui il valore della CAC può essere ottenuto dal punto di intersezione della tangente alla porzione di curva crescente con la tangente alla porzione piana della curva stessa.

### **1.1.5 Caratterizzazione della struttura micellare**

La caratterizzazione della struttura micellare fornisce informazioni circa la distribuzione dimensionale, la microstruttura, le dimensioni del *core*, il numero di aggregati micellari e la densità delle micelle.

Le dimensioni e la morfologia delle micelle vengono rivelate attraverso studi di *Light Scattering*.

La morfologia delle micelle polimeriche è influenzata dalla conformazione dei copolimeri che le costituiscono, dalla loro concentrazione e dal tipo di solvente utilizzato per la preparazione dei sistemi.

Le micelle polimeriche hanno generalmente dimensioni comprese nel *range* di 10-100 nm, che gli consente il passaggio attraverso le fenestrature dei vasi sanguigni, la possibilità di essere sterilizzate semplicemente mediante filtrazione e la minimizzazione del rischio di embolia nei capillari [Kwon G.S. and Okano T., 1996].

Raramente le dimensioni micellari superano i 100 nm, ma ciò dipende da diversi fattori quali il peso molecolare del copolimero, la proporzione tra le catene idrofile e idrofobe, il numero di

aggregazione e dal metodo usato per la loro preparazione. Ad esempio, la dimensione delle micelle preparate mediante il metodo della dialisi può essere influenzata dal solvente organico usato per dissolvere il polimero [La S.B. *et al.*, 1996].

Le dimensioni micellari possono anche essere determinate mediante Microscopia a Trasmissione Elettronica (TEM) [Yu B.G. *et al.*, 1998] e Microscopia a Scansione Elettronica (SEM) [Kim S.Y. *et al.*, 1998].

### **1.1.6 Impiego delle micelle per il direccionamento dei farmaci**

Le micelle polimeriche trovano diverse applicazioni in campo farmaceutico, tra le quali, la più diffusa è l'impiego per la veicolazione di farmaci antitumorali in seguito a somministrazione parenterale.

Oltre a quanto fino ad ora descritto, un'altra caratteristica importante di questi nanovettori è la possibilità di coniugare sulla loro superficie dei ligandi specifici per alcuni tessuti [Gref R. *et al.*, 1994; Inoue *et al.*, 1998] che permette di ottenere un direccionamento attivo verso una determinata regione dell'organismo e di aumentare l'efficacia farmacologica del farmaco incorporato.

- ***Targeting attivo***

Il *targeting attivo* viene realizzato mediante la funzionalizzazione della superficie dei *carrier* con ligandi selettivamente riconosciuti dai recettori presenti sulla superficie delle cellule interessate [Torchilin V. P., 1998].

Queste interazioni specifiche permettono l'accumulo selettivo del farmaco solo nel sito *target* tumorale con conseguente riduzione degli

effetti collaterali ed assorbimento cellulare dei farmaci attraverso il meccanismo dell'endocitosi [Bae Y. *et al.*, 2005].

Il *targeting attivo* viene realizzato utilizzando interazioni biologicamente specifiche, come il legame antigene anticorpo o l'aggiunta di un gruppo pH-sensibile o termosensibile in funzione delle caratteristiche biologiche del tessuto tumorale. Esso sfrutta le caratteristiche mostrate dalle cellule tumorali come la sovraespressione degli antigeni di superficie delle cellule tumorali e la natura relativamente più acida del tessuto tumorale (pH 7.0) rispetto a quella del tessuto normale (pH 7.4).

Le micelle portanti il folato come ligande sono principalmente usate per il trasporto intracellulare di farmaco. In seguito al loro ingresso all'interno delle cellule, il farmaco dovrebbe essere rilasciato intracellularmente. Questa possibilità viene garantita rendendo le micelle pH-sensibili in modo da consentire il rilascio selettivo nel compartimento endosomiale il cui pH è pari a 5-6. Il folato si comporta come ligande ad alta affinità per i suoi recettori, le proteine leganti il folato, che sono sovraesprese sulla superficie delle cellule cancerose. Elevati livelli di recettori per il folato sono espressi sulle cellule epiteliali tumorali di vari organi come il colon, l'intestino, la prostata, le ovaie, le ghiandole mammarie, e il cervello, perciò, i sistemi coniugati con il folato, possono essere direzionati alle cellule bersaglio e internalizzati attraverso l'endocitosi mediata dal recettore [Campbell I.G. and Jones TA, 1991; Sudimack J. and Lee RJ. 2000].

Un altro ligande disponibile per il *targeting* al tessuto tumorale è la transferrina, il cui recettore è sovraespresso sulle cellule cancerose in maniera proporzionale al grado di malignità.

Il *sistema termo-responsivo* può essere impiegato per aumentare il rilascio del farmaco e/o il trasporto vascolare mediante cambiamento della temperatura locale. Nei tessuti interessati da eventi patologici si assiste ad un aumento della temperatura di circa 2-5°C rispetto a quella dei tessuti normali.

I tessuti tumorali possiedono un valore di pH più basso rispetto a quello dei tessuti normali, infatti mentre in quest'ultimi il pH è pari a 7.4, nei siti tumorali il pH oscilla tra 5.7 e 7.0. L'ambiente acido del tessuto tumorale è la base per lo sviluppo di *drug delivery systems* sensibili alle variazioni di pH, come le micelle pH-sensibili che potrebbero servire per il rilascio specifico del farmaco nel tessuto tumorale, nei tessuti infiammati e nei compartimenti endosomiali.

- ***Targeting passivo***

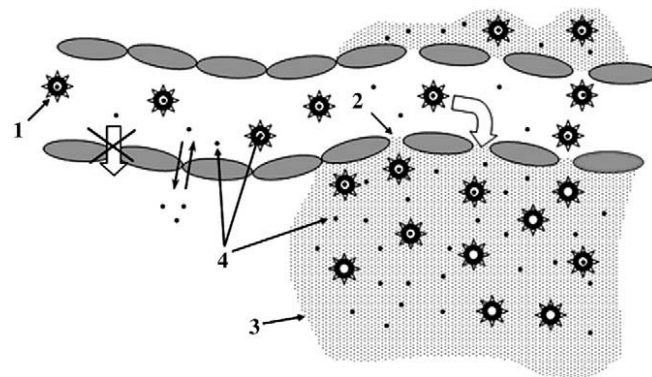
Il *targeting passivo* consiste nell'accumulo preferenziale degli agenti chemioterapici nei tumori solidi come risultato di un'aumentata permeabilità vascolare del tessuto tumorale rispetto al tessuto sano, effetto noto come *EPR (Enhanced Permeability and Retention effect)* [Jain R.K., 1997] (vedi figura 5).

L'effetto EPR, tipico per i tumori solidi o per i tessuti infartuati, è basato sulla penetrazione spontanea di macromolecole a lunga circolazione, di aggregati molecolari e di *drug carrier* particellari negli interstizi presenti nel sistema vascolare compromesso,

aumentando così l'indice terapeutico e diminuendo gli effetti collaterali causati dall'accumulo del farmaco nei tessuti sani, poiché è nota l'assenza di specificità dei farmaci antitumorali [Maeda H., et al., 2000].

Studi di tipo patologico, farmacologico e biochimico sul tessuto tumorale hanno evidenziato che in un tumore solido generalmente si verifica ipervascolarizzazione e secrezione di fattori di permeabilità vascolare che stimolano l'extravasazione. Anche il sistema vascolare possiede qualche anomalia rappresentata da un aumento nel numero delle cellule endoteliali che forniscono i nutrienti necessari per lo sviluppo della cellula tumorale, un'aumentata tortuosità e un'alterazione della membrana basale. Il sistema vascolare è anche caratterizzato dalla presenza di vasi linfatici immaturi, in cui il drenaggio è notevolmente ridotto e ciò consente uno stazionamento più a lungo dei *nanocarrier* nel tessuto tumorale.

Per realizzare il *targeting passivo*, le micelle devono circolare nel sangue per un lungo periodo e le loro dimensioni determinano il loro destino: infatti, poichè nei vasi tumorali si verifica un aumento delle dimensioni delle fenestrate, le micelle possono essere eliminate come tali in distretti diversi in funzione delle loro dimensioni: le micelle con dimensioni inferiori ai 10 nm sono facilmente eliminate attraverso i glomeruli renali, mentre le micelle più grandi con dimensioni nel *range* di 50-100 nm sono eliminate dal fegato e dalla milza [Schiffelers R.M. et al., 1999].



**Figura 5.** Effetto EPR: micelle polimeriche a lunga circolazione (1) penetrano attraverso le fenestrature del sistema vascolare (2) nel tessuto tumorale (3) dove si degradano, rilasciando il farmaco libero (4) e generando così una elevata concentrazione locale del principio attivo

## 1.2 IDROGELI

Gli idrogeli sono *networks* polimerici, formati da polimeri idrofili altamente affini al mezzo acquoso che messi a contatto con esso, ad esempio i liquidi fisiologici, sono in grado di assorbire acqua e rigonfiare mantenendo inalterata la loro struttura tridimensionale.

Gli idrogeli *swellati* acquisiscono caratteristiche fisiche che li rendono simili ai tessuti viventi, come la consistenza morbida e gommosa, la bassa tensione interfacciale con l'acqua e con i fluidi biologici [Ratner B.D. et al., 1976; Hennink W.E. and van Nostrum C.F., 2002].

L'abilità a rigonfiare in condizioni fisiologiche, rende gli idrogeli materiali ideali per applicazioni biomediche [Gao D. et al., 2007]. La natura elastica degli idrogeli ampiamente *swellati* o idratati minimizza le irritazioni che si manifestano nei tessuti circostanti dopo il loro impianto. La bassa tensione interfacciale fra la superficie dell'idrogel e i fluidi fisiologici minimizza l'adsorbimento delle proteine e l'adesione cellulare, con conseguente riduzione di effetti collaterali in seguito a reazioni immunitarie.

Gli idrogeli possono essere classificati come neutri o ionici, in funzione della natura dei gruppi presenti in catena laterale. Mentre negli idrogeli di tipo ionico lo *swelling* è dovuto ad interazioni fisiche che si sviluppano tra le molecole di acqua e i gruppi ionici dell'idrogel, negli idrogeli neutri la *driving-force* per lo *swelling* è data dal contributo termodinamico derivante dalla miscelazione dell'acqua con il polimero e dal contributo derivante dall'elasticità del polimero stesso [Peppas N.A. et al., 2000].



In funzione del tipo di legame che si instaura tra le catene polimeriche da cui derivano gli idrogeli, essi possono essere classificati in idrogeli fisici e idrogeli chimici.

Negli idrogeli fisici il reticolo si forma in seguito ad interazioni deboli di tipo fisico tra le catene macromolecolari quali legami ad idrogeno, interazioni ioniche, interazioni di van der Waals o interazioni idrofobiche, formando idrogeli che non mantengono la loro integrità strutturale ma si dissolvono facilmente nel mezzo di rigonfiamento ad alte temperature.

Negli idrogeli chimici, definiti anche sistemi polimerici reticolati, le catene polimeriche sono connesse mediante legami di tipo covalente, che fanno sì che questi materiali, dopo il rigonfiamento, conservino la loro integrità strutturale nonostante sia possibile una loro degradazione se nella struttura sono presenti legami particolarmente sensibili all'idrolisi chimica o enzimatica. Tuttavia, questi sistemi rispetto agli idrogeli fisici presentano una migliore stabilità chimica, meccanica e termica.

### **1.2.1 Preparazione degli idrogeli**

I polimeri utilizzati per la preparazione degli idrogeli devono essere insolubili, subire un rigonfiamento limitato in acqua e nei fluidi biologici, non essere tossici e trovarsi preferibilmente allo stato vetroso alla temperatura corporea. Essi possono essere formulati in un'ampia varietà di forme fisiche, come film, microparticelle e nanoparticelle.

I metodi più comuni per la formazione di idrogeli di tipo chimico sono:

- *Copolimerizzazione e reticolazione simultanea di uno o più monomeri monofunzionali e/o un monomero multifunzionale seguita dal rigonfiamento in un mezzo penetrante appropriato.*

Con questa metodica si verifica contemporaneamente la sintesi del polimero a partire da monomeri insaturi a basso peso molecolare e la loro reticolazione attraverso l'uso di agenti reticolanti polifunzionali al fine di ottenere il *network* polimerico. Queste reazioni vengono usate soprattutto per produrre idrogeli dai poliidrossialchilmetacrilati.

È un metodo versatile, applicabile ad un'ampia varietà di polimeri ma è difficile controllare il grado di reticolazione che andrà ad influenzare sia il grado di *swelling* sia la velocità di rilascio delle sostanze incorporate.

- *Reticolazione di un omopolimero o copolimero in soluzione o allo stato solido e successivo rigonfiamento in acqua o in fluido biologico.* Con questa tecnica sono stati ottenuti idrogeli chimici mediante reticolazione radicalica di polimeri solubili in acqua precedentemente derivatizzati con gruppi reattivi nei confronti delle reazioni radicaliche (es. gruppi vinilici).

È una metodica che permette di ottenere idrogeli con un miglioramento del profilo tossicologico, in quanto si parte da un prodotto già ben caratterizzato e si riduce la presenza di residui a basso peso molecolare.

Permette inoltre il controllo del grado di reticolazione e quindi della capacità di *swelling* e delle proprietà meccaniche del gel.

Entrambe le metodiche possono essere realizzate per via chimica o per trattamento con radiazioni elettromagnetiche.

La reticolazione per via chimica sfrutta la reattività dei gruppi funzionali del polimero idrosolubile (principalmente -OH, -COOH, -NH<sub>2</sub>) che possono reagire con altri gruppi funzionali complementari appartenenti o ad altri polimeri o ad agenti reticolanti, come ammine o acidi carbossilici, per formare legami covalenti tra le catene polimeriche.

I polimeri idrosolubili possono essere convertiti in idrogeli usando agenti reticolanti bi- o anche poli- funzionali che reagiscono con i gruppi funzionali dei polimeri per reazione di addizione.

Le proprietà del *network* possono essere facilmente controllate dalla concentrazione del polimero dissolto e dalla quantità di agente reticolante.

I *metodi fisici* usati nella formazione degli idrogeli prevedono l'utilizzo di radiazioni a bassa energia (radiazioni UV) o ad alta energia (radiazioni  $\gamma$ ).

L'utilizzo delle radiazioni  $\gamma$  ad alta energia permette la reticolazione di polimeri solubili in acqua privi di gruppi portanti doppi legami reattivi e questa tecnica viene adottata per soluzioni acquose di polimeri e per composti allo stato solido. La radiolisi dell'acqua genera radicali ossidrilici che possono determinare la formazione di macroradicali nelle catene polimeriche capaci di indurre la reticolazione.

Questa tecnica richiede la presenza di atmosfera inerte, poiché l'ossigeno potrebbe reagire con i macroradicali formati e spegnere la reazione radicalica. Inoltre, consente l'impiego di condizioni di

irraggiamento blande, il non utilizzo di catalizzatori e iniziatori radicalici e una contemporanea sterilizzazione dell'idrogel.

Però i raggi  $\gamma$  richiedono apparecchiature ad alto costo, comportano rischi per l'operatore e possibile degradazione dei costituenti il sistema.

Per questo motivo, si usano molto più frequentemente i raggi UV, in quanto radiazioni a bassa energia, meno penetranti e quindi non comportano alti rischi per l'operatore, minimizzano la degradazione dei costituenti il sistema, ma potrebbero richiedere l'impiego di catalizzatori o iniziatori radicalici. I raggi UV sono più selettivi in quanto interagiscono solo con i cromofori che assorbono alla lunghezza d'onda utilizzata per l'irraggiamento.

Le radiazioni UV hanno la capacità di eccitare elettroni  $\pi$  e gli elettroni di non legame della maggior parte delle molecole organiche. Le transizioni che interessano i doppi legami sono del tipo  $\pi$ - $\pi^*$  con formazione di specie radicaliche che sono coinvolte nei processi fotochimici di polimerizzazione.

Con questa tecnica sono stati reticolati diversi sistemi polimerici in cui sono state introdotte delle funzioni suscettibili all'azione delle radiazioni ultraviolette allo scopo di ottenere idrogeli con differenti caratteristiche e possibilità di applicazione [Tripodo et al., 2005; Pitarresi et al., 2003; Giammona G. et al., 2000].

## 1.2.2 Caratterizzazione chimico-fisica degli idrogeli

### 1.2.2.1 Grado di rigonfiamento (*swelling*)

La porzione idrofila è il componente strutturale che maggiormente influenza le proprietà dell'idrogel, in quanto determina la quantità di acqua che il *network* può assorbire.

In funzione della densità dei gruppi idrofili presenti sul polimero, l'assorbimento di acqua può aumentare anche di circa 1000 volte il peso del *network* rispetto a quello iniziale. Durante l'idratazione del gel, le catene polimeriche interagiscono con le molecole di solvente e si espandono fino ad ottenere uno stato pienamente solvatato. Mentre il materiale si espande, la struttura reticolata si oppone all'eccessivo aumento di volume delle catene polimeriche mediante forze retrattive [Flory P.J., 1953]. Il bilancio delle forze di espansione e di retrazione raggiunge l'equilibrio nel solvente a determinate temperature.

Lo *swelling* di un idrogel è un parametro chiave per il suo utilizzo in diverse applicazioni, perché il rapporto di equilibrio di *swelling* ( $q$ ) influenza il coefficiente di diffusione del soluto, la mobilità superficiale e le proprietà ottiche e meccaniche dell'idrogel [Langer R. and Peppas N.A., 2003; Peppas N.A. et al., 2006].

Il grado di *swelling* di un idrogel può essere espresso come:

|  |   |
|--|---|
| Rapporto dei volumi all'equilibrio   | $q = V_s/V_d$                             |
| Rapporto dei pesi all'equilibrio   | $q = W_s/W_d$                             |
| Rapporto tra la quantità di acqua assorbita all'equilibrio e peso del gel secco      | $S_w (\%) = (W_s - W_d) / W_d \times 100$ |
| Rapporto tra la quantità di acqua assorbita all'equilibrio e peso del gel rigonfiato | $S_w (\%) = (W_s - W_d) / W_s \times 100$ |

$V_s$  = volume del gel rigonfio;  $V_d$  = volume del gel secco;

$W_s$  = peso del gel rigonfio;  $W_d$  = peso del gel secco.

Le proprietà fisiche degli idrogeli swellati sono regolate dal peso molecolare del polimero ( $M_w$ ), dalle cariche sui polimeri, dalla densità di *cross-linking* (*networks* legati covalentemente), dalla presenza di soluti all'interno dell'idrogel, dal valore di pH del mezzo esterno, dalla temperatura, dalla forma del *network*, dal tipo di solvente e dalla forza ionica del mezzo penetrante.

Ad esempio, i polimeri ad alto peso molecolare sono normalmente caratterizzati da legami crociati multipli da cui si originano idrogeli più compatti che avranno un rigonfiamento limitato a causa del limitato spazio libero tra le catene polimeriche, mentre i polimeri a minore peso molecolare caratterizzati da un minor grado di *crosslinking* subiranno un maggiore *swelling* e dovranno essere utilizzati a più alte concentrazioni per generare idrogeli con sufficiente rigidità [Anseth K.S. et al., 1996]. Queste proprietà sono importanti nel proteggere le molecole attive incorporate nel sistema da deformazioni meccaniche che possono avvenire durante l'impianto o durante la migrazione nel tratto gastrointestinale per un idrogel somministrato oralmente [Ingber D. et al., 1993].

Lo *swelling* è inoltre favorito da un'alta idrofilia della matrice e dalla presenza di idrogeli sottoforma di micro o nano particelle in cui vi è un'elevata superficie specifica che favorisce il contatto con le molecole di solvente.

#### **1.2.2.2 Porosità del network**

Importanti parametri che regolano la diffusione del principio attivo incapsulato nel *network* sono le dimensioni dei pori o delle maglie dell'idrogel e le dimensioni idrodinamiche del farmaco [Lin C.C. and Metters A.T., 2006].

La struttura degli idrogeli può essere macroporosa, microporosa o non porosa. La porosità e la tortuosità del gel sono importanti in quanto influenzano la velocità di rilascio del principio attivo.

Gli idrogeli macroporosi hanno pori di dimensioni di 0,1-1  $\mu\text{m}$ . Questi idrogeli rilasciano il farmaco intrappolato dentro i pori attraverso un meccanismo dipendente dal coefficiente di diffusione del farmaco.

Gli idrogeli microporosi hanno pori di dimensioni comprese tra 100 e 1000  $\text{\AA}$ . Il farmaco viene rilasciato attraverso un meccanismo di diffusione molecolare e di convezione. Infine, gli idrogeli non porosi sono strutture macromolecolari con pori di dimensioni molto piccole, comprese tra 10 e 100  $\text{\AA}$ . In questo caso, il rilascio del farmaco avviene solo per diffusione.

#### **1.2.3 Incorporazione di un principio attivo in un idrogel**

Il caricamento del principio attivo (farmaco, proteina o macromolecola) in un idrogel può avvenire tramite:

- *incorporazione* durante la formazione dell'idrogel. Questa tecnica prevede che il farmaco venga disciolto o disperso nel monomero liquido, o in una soluzione del monomero o del polimero preformato prima della reticolazione. Il principio attivo deve essere stabile nelle condizioni di reticolazione adottate. È un metodo che permette la migliore incorporazione del farmaco nelle maglie della matrice e un suo successivo lento rilascio dal reticolo, ma può verificarsi perdita di farmaco durante la fase di purificazione dell'idrogel ottenuto;
- *impregnazione*, ossia caricamento del principio attivo nell'idrogel già formato, mediante diffusione attraverso i pori della matrice [Kim S.W. et al., 1992]. Questa tecnica prevede che la matrice venga posta a rigonfiare a contatto con una soluzione concentrata del farmaco per un tempo variabile, e poi seccata. Il problema consiste nel trovare un solvente che solubilizzi il farmaco e contemporaneamente faccia rigonfiare la matrice e nel fatto che, mediante l'impregnazione il farmaco potrebbe rimanere in parte in superficie dando così un *burst effect* iniziale quando la matrice viene posta a contatto con i fluidi fisiologici simulati, seguito da un rilascio più prolungato dell'aliquota che rimane dentro il network [Huang X. and Brazel C.S., 2003; Jeong B. et al., 2000].

In alcuni casi, se mediante l'utilizzo di una matrice reticolata non si raggiunge una cinetica di rilascio del farmaco sufficientemente lenta da garantire un rilascio sostenuto per diverse settimane, allora nell'idrogel può essere incorporato un altro sistema di rilascio, come



ad esempio micro- o nano- particelle cariche di farmaco in modo da avere un doppio controllo della cinetica di rilascio [Kim S.W. *et al.*, 1992].

In alternativa, il caricamento può essere realizzato legando covalentemente il principio attivo alla matrice polimerica in modo che il rilascio sia principalmente controllato dalla velocità di idrolisi chimica e/o enzimatica del legame farmaco-polimero [Kohane D.S. and Langer R., 2008] o dalla velocità di degradazione dello stesso idrogel.

Tuttavia, il meccanismo di rilascio dei sistemi così caricati, non è specifico e quindi non è possibile effettuare un buon controllo della velocità di rilascio.

#### **1.2.4 Meccanismi di rilascio del farmaco**

Il principale meccanismo che regola il rilascio del principio attivo è la diffusione di esso attraverso i pori della matrice polimerica verso l'ambiente circostante o la ripartizione di esso tra la matrice e l'ambiente circostante [Amsden B., 1998].

La velocità di diffusione del principio attivo dipende dal grado di reticolazione della matrice.

La cinetica di diffusione è di ordine primo e segue la legge di diffusione di Fick.

Il rilascio del farmaco può essere controllato dalla velocità di rigonfiamento della matrice polimerica in funzione sia della resistenza che il polimero offre all'aumento di volume, sia dell'affinità che il soluto mostra nei confronti della matrice (interazioni ioniche e/o idrofobiche) e del mezzo di rigonfiamento.

Quando la velocità di diffusione del farmaco nell'idrogel rigonfio è molto più elevata rispetto alla velocità di distensione delle maglie dell'idrogel, lo *swelling* è considerato il parametro che influenza la velocità di diffusione, la cinetica di rilascio sarà di ordine zero e il meccanismo di rilascio sarà non Fickiano [Siepmann J. and Peppas N.A., 2001], viceversa si avrà un rilascio controllato dalla diffusione secondo la legge di Fick.

Se la velocità di diffusione è paragonabile a quella di *swelling*, si avrà un rilascio definito *anomalo*, cioè è possibile che esistano lenti processi di rilassamento delle catene macromolecolari che al pari della diffusione determinano la velocità di rilascio.

Il rilascio controllato chimicamente è determinato da reazioni chimiche che avvengono dentro la matrice. Queste reazioni includono la scissione della catena polimerica per degradazione idrolitica o enzimatica.

### **1.2.5 Sistemi sensibili a modificazioni ambientali**

Sono stati messi a punto idrogeli che possono controllare il rilascio del farmaco mediante cambiamenti della loro struttura in risposta a stimoli esterni, quali pH, temperatura, forza ionica e campo elettrico. Essi hanno la capacità di rilevare piccoli cambiamenti delle condizioni ambientali e di rispondere a quest'ultimi modificando il loro stato fisico o chimico attraverso cambiamenti reversibili di volume.

Per questa loro versatilità vengono definiti “**idrogeli intelligenti**” o “**idrogeli sensibili**” [Park S.Y., 1999]. Pertanto, è possibile sfruttare le caratteristiche chimico-fisiche proprie del polimero ma anche

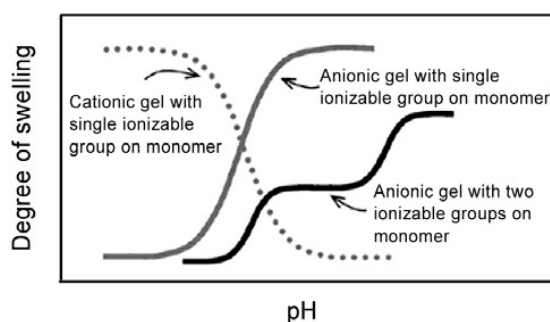
funzionalizzarlo al fine di ottenere la responsività desiderata e un rilascio controllato del farmaco intrappolato nell'idrogel.

### 1.2.5.1 Idrogeli pH sensibili

Gli idrogeli pH sensibili possiedono gruppi ionizzabili in catena laterale quali gruppi acidi (acidi carbossilici e sulfonici) o basici (funzioni amminiche) che variano il loro stato di ionizzazione in risposta a variazioni di pH del mezzo esterno.

I polimeri pH-sensibili possono essere classificati come polielettroliti debolmente acidi e polielettroliti debolmente basici in funzione del tipo di ionizzazione, ossia come donatori o accettori di protoni. Gli idrogeli anionici si deprotonano e rigonfiano molto quando il pH esterno è più alto del  $pK_a$  dei gruppi ionizzabili legati alle catene polimeriche, mentre gli idrogeli cationici si deprotonano e rigonfiano molto quando il pH esterno è più basso del  $pK_b$  dei gruppi ionizzabili [Lin CC. and Metters AT., 2006].

In funzione della natura acida, basica o neutra del monomero usato per preparare l'idrogel, le curve di *swelling* pH-dipendenti, mostrano uno o più punti di flesso vicino il rapporto  $pK_a/pK_b$  dei gruppi ionizzabili (figura 6).



**Figura 6.** Rigonfiamento di un idrogel ionico in funzione del pH

La presenza di gruppi ionizzabili nelle catene polimeriche risulta in uno *swelling* maggiore di quello ottenuto con gli idrogeli polimerici con gruppi non ionizzabili. Infatti lo *swelling* degli idrogeli polielettrolitici è principalmente dovuto alle repulsioni elettrostatiche tra le cariche presenti nel *backbone* polimerico.

Tipici polimeri pH sensibili contenenti gruppi acidi usati nella preparazione degli idrogeli sono polimeri contenenti gruppi carbossilici, quali acido poliacrilico [Bai L. et al., 2008], acido polimetacrilico, acido poliglutammico e i polimeri contenenti gruppi solfonamidici [Park SY. and Bae YH., 1999].

Esempi di polielettroliti basici includono i polimetilmetacrilati (PMMA) [Butun V. et al., 2001] polidimetilaminoetilmetacrilato (PDEAEMA), poli(2-vinilpiridina) e poli( $\beta$ -amminoestere).

Sebbene questi polimeri abbiano natura idrofobica, rigonfiano in acqua in funzione del pH del mezzo esterno. Ogni cambiamento nel valore di pH dell'ambiente biologico determina cambiamenti nel comportamento di *swelling*.

Un esempio di *carrier* polimerico pH-sensibile, è quello a base di poli(vinilpirrolidone-co-anidride dimetilmaleica) (PVD) coniugato con la doxorubicina, la quale viene lentamente rilasciata come farmaco libero in risposta a cambiamenti di pH da valori prossimi alla neutralità a valori debolmente acidi [Kamada H., et al., 2004].

Idrogeli pH sensibili vengono inoltre utilizzati per il rilascio colon specifico di cui si parlerà in seguito.

Idrogeli policationici di tipo fisico a base di chitosano e di polietilenossido (POE) possono essere usati per la veicolazione di antibiotici nello stomaco per il trattamento di *Helicobacter Piloni*

grazie alla loro capacità di rigonfiare in ambiente acido [Patel V.R., 1996].

#### **1.2.5.2 Idrogeli termosensibili**

Gli idrogeli termosensibili sono impiegati per la veicolazione di farmaci sensibili alle variazioni di temperatura.

La caratteristica comune dei polimeri termosensibili è la presenza di gruppi idrofobici, che inducono variazioni nel *network* in risposta a variazioni di temperatura, influenzando così il rilascio del farmaco.

Il parametro da tenere in considerazione per questi sistemi è la *temperatura di soluzione critica*, ossia la temperatura alla quale il polimero risulta essere solubile e affine al mezzo di rigonfiamento. La temperatura di soluzione critica, dipende dal bilancio tra interazioni idrofile ed interazioni idrofobiche del polimero. A seconda della temperatura prevarranno le une o le altre determinando o un buon grado di *swelling* o il collasso dell'idrogel.

In particolare, gli idrogeli termosensibili negativi sono caratterizzati da una temperatura critica inferiore di soluzione (LCST) e, a temperature più basse di essa prevarranno le interazioni ad idrogeno tra le catene idrofile del polimero e le molecole di acqua inducendo un aumentato *swelling* della matrice. All'aumentare della temperatura invece, prevarranno le interazioni idrofobiche tra i segmenti idrofobici e di conseguenza l'idrogel tenderà a restringersi o a collassare.

Esempi di polimeri con LCST sono poli(N-isopropilacrilammide) (PNIPAM), Poli(N,N-dietilacrilammide) (PDEAM), Poli(N-etilmetilacrilammide) (PNEMAM), Poli(metilvinil etero) (PMVE), Poli(2-etossietilvinil etero) (PEOVE), Poli(N-vinilcaprolattone) (PNVCa),

Poli(*N*-vinilisobutilammide) (PNVIBAM), Poli(*N*-vinil-*n*-butilammide) (PNVIBAM).

Questi sistemi sono stati impiegati per ottenere un rilascio di sostanze di tipo *on-off* in risposta a cambiamenti di temperatura utilizzati per la veicolazione di farmaci antitumorali, antidiabetici, ormoni, proteine e/o peptidi. In particolare è stato creato un sistema a base di poli(*N*-isopropilacrilammide) (PNIPAM) per un rilascio controllato *on/off* di avidina/biotina [Bulmus V., et al., 2000]. Al di sotto della temperatura di transizione di 32° C, i copolimeri di PNIPAM si trovano in acqua in una conformazione totalmente estesa grazie alle favorevoli interazioni polimero-acqua. Questa conformazione del copolimero interferisce con il sito di legame della biotina sulla avidina, mentre al di sopra della temperatura di transizione, i copolimeri sono collassati e non possono interferire con i siti di legame.

Gli idrogeli termosensibili positivi possiedono una temperatura critica superiore di soluzione (UCST) [Qiu Y. and Park K., 2001]. All'aumentare della temperatura essi tenderanno a *swellare*, mentre quando la temperatura diminuisce al di sotto del valore critico, essi tenderanno a collassare. Questo comportamento è tipico degli idrogeli interpenetranti (*interpenetrating networks*, IPNs).

La temperatura di soluzione critica può essere variata cambiando il rapporto tra le catene idrofile e quelle idrofobe che costituiscono il polimero.

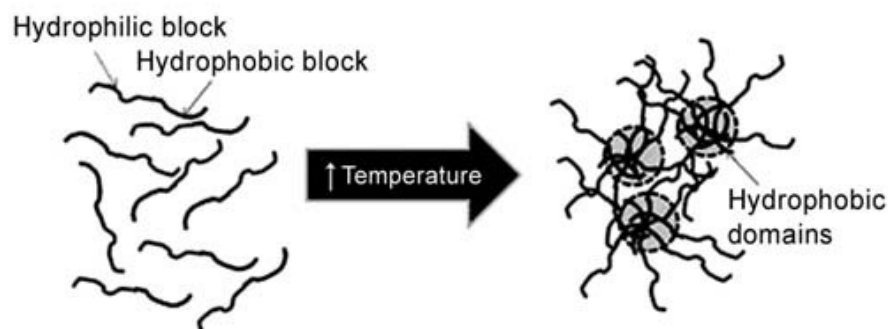
Ad esempio sono stati creati dei sistemi costituiti da una combinazione di acido poliacrilico e poliacrilammide [Aoki T., 1994]. L'IPN ottenuto è molto stabile a 70 °C in soluzione acquosa e lo *swelling* di questo sistema è reversibile e risponde a variazioni di

temperatura sebbene all'aumentare del contenuto di butilmetacrilato (BMA) aumenta la temperatura di transizione con una riduzione del grado di *swelling* del sistema. Il rilascio pulsatile del farmaco viene realizzato mediante lo stato di “on” del sistema ad alte temperature e lo stato di “off” a temperature più basse. Questi idrogeli possono essere utilizzati per il rilascio di alcuni farmaci come, ad esempio, il ketoprofene [Aoki T., 1994].

Infine, gli idrogeli termicamente reversibili sono quelli che possono subire una transizione di fase ciclica (sol-gel) in quanto le loro catene polimeriche non sono legate covalentemente.

I gel termicamente reversibili, con dipendenza inversa dalla temperatura, diventano sol a temperature molto alte.

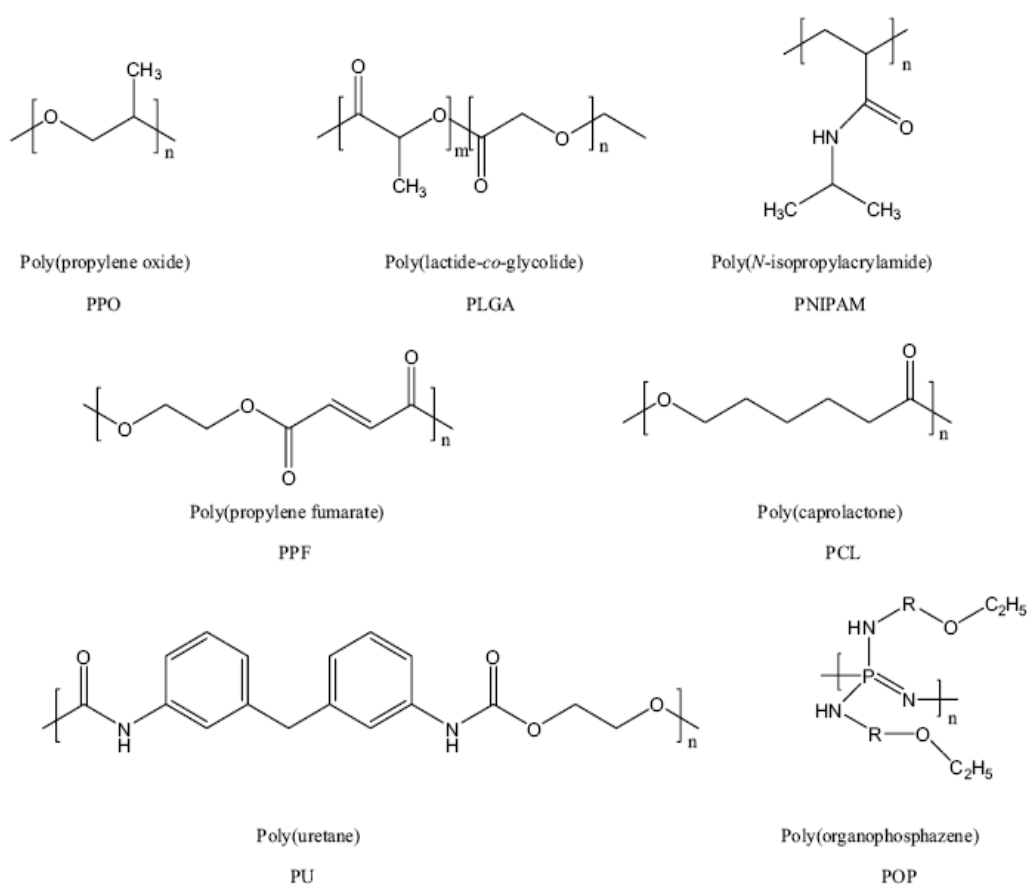
I polimeri con domini idrofobici possono reticolare in ambiente acquoso attraverso una gelificazione con dipendenza inversa dalla temperatura (figura 7).



**Figura 7.** Meccanismo di gelificazione fisica *in situ* guidata dalle interazioni idrofobiche

All'aumentare della temperatura, le porzioni idrofobiche si aggregano per minimizzare il contatto con l'acqua circostante, e massimizzare l'entropia del solvente. La temperatura alla quale avviene la gelificazione dipende dalla concentrazione e dalla struttura chimica del polimero [Hoare TR. and Kohane DS., 2008].

Le strutture chimiche di comuni blocchi idrofobici che possono subire una gelificazione di questo tipo vicino il valore di temperatura corporea sono mostrati in figura 8.



**Figura 8.** Strutture chimiche di blocchi idrofobici termoreversibili

Questo comportamento è mostrato da copolimeri di POE e POP conosciuti come *Pluronics*, *Tetronics*, *Lutrol*, *Poloxamers*.



Una soluzione acquosa di *poloxamers* ha una transizione di fase da sol a gel a 5-30°C e da gel a sol a 35-50°C per concentrazione di polimero tra 20-30% p/p. Il meccanismo di transizione è dovuto al restringimento della corona di POE delle micelle a causa dell'effetto della temperatura sulla solubilità del POE e sull'interazione delle catene di POE con il core POP [Jeong B. and Gutowska A., 2002].

Grazie a queste proprietà, i sistemi termosensibili sono utilizzati nello sviluppo di sistemi di rilascio controllato del farmaco basati sulla conversione di fase sol-gel alla temperatura corporea.

#### ***1.2.5.3 Idrogeli pH- e termo- sensibili***

Questo tipo di idrogeli possono essere realizzati mediante incorporazione di gruppi ionizzabili e idrofobici (termosensibilità inversa) nello stesso *network*. È possibile copolimerizzare un monomero termosensibile come la N-isopropilacrilamide e un monomero pH-sensibile come l'acido acrilico o l'acido metacrilico [Serres A. et al., 1996].

Quando una piccola quantità di monomeri anionici, come acido acrilico, viene incorporata in un polimero termoreversibile, la LCST dell'idrogel sarà influenzata dalla ionizzazione dei gruppi carbossilici laterali. Aumentando il pH del mezzo sopra il  $pK_a$  dei gruppi carbossilici, la LCST si sposta a temperature più alte a causa delle aumentate idrofobicità e repulsione di cariche.

Alcuni esempi sono dati da polimeri costituiti da NIPAAm, polidimetilsilossano con gruppi vinilici terminali ed acido acrilico utilizzati per il rilascio di indometacina ed amilasi [Dong L.H. and Hoffman A.S., 1995; Bae Y.H., 1991; Okano T., 1990].

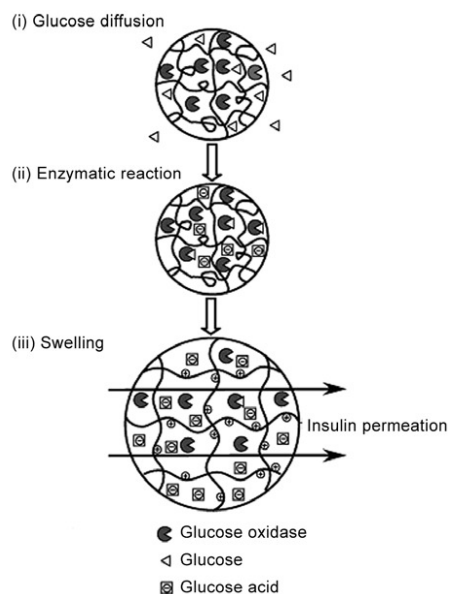
#### **1.2.5.4 Idrogeli responsivi a stimoli biologici**

Questo tipo di idrogeli subiscono modificazioni strutturali e/o morfologiche in risposta ad uno stimolo biologico, e sono stati studiati per numerose applicazioni nel *drug delivery*, nella rigenerazione tissutale, e nei sistemi biomimetici [Ulijn RV. *et al.*, 2007].

Uno dei campi in cui gli idrogeli stimolo sensibili possono trovare un'importante applicazione è nella veicolazione di peptidi e proteine, tra cui l'insulina utilizzata nel trattamento del diabete.

Normalmente i pazienti affetti da diabete si autosomministrano dosi giornaliere di insulina per via sottocutanea inducendo però rischi connessi a somministrazioni di una dose eccessiva o ridotta di enzima accompagnati da diminuzione della *compliance*. Per ovviare a questo problema, molti lavori sono stati incentrati sulla creazione di sistemi in cui l'insulina viene rilasciata in quantità adeguate in risposta ad aumentati livelli di zucchero nel sangue, in modo da creare sistemi per il potenziale trattamento autonomo del diabete [Miyata T. *et al.*, 2002].

In particolare, sono stati creati dei sistemi in cui sulla superficie di un *carrier* polimerico di natura basica sono state immobilizzate molecole dell'enzima glucosio ossidasi che converte il glucosio ad acido gluconico abbassando temporaneamente il pH del mezzo in cui si trova l'idrogel. I gruppi basici sul polimero verranno protonati causando *swelling* dell'idrogel con conseguente rilascio dell'insulina incorporata (figura 9).



**Figura 9.** Rappresentazione dell'idrogel sensibile al glucosio contenente glucosio ossidasi sulla sua superficie

In seguito al rilascio dell'insulina, i livelli di glucosio diminuiscono, il pH tenderà ad aumentare, i gruppi basici verranno deprotonati e l'idrogel tenderà a ritornare nello stato non swellato, impedendo così l'ulteriore rilascio di farmaco. È un sistema che funziona a *feedback* negativo.

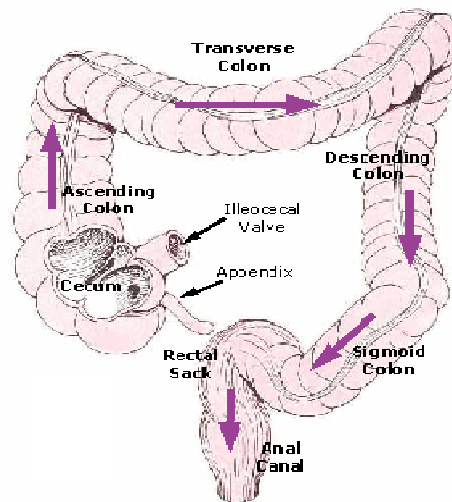
Gli idrogeli responsivi a stimoli biologici possono anche essere progettati in modo da essere degradati in risposta a stimoli esterni quali gli enzimi. È stato messo a punto un sistema costituito da sequenze peptidiche assemblate, che rilasciano i farmaci caricati in seguito ad interazioni specifiche con le proteasi che si sviluppano in uno stato patologico [Law B. et al., 2006].

Kim et al. hanno preparato un idrogel PNIPAm-co-AAc mediante fotopolimerizzazione con un peptide come *cross-linker* che fornisce all'idrogel la possibilità di essere degradato enzimaticamente [Kim S.

*and Healy KE., 2003*]. L'idrogel viene degradato in funzione della densità di *cross-linking* e della concentrazione di enzima.

### 1.3 COLON DRUG DELIVERY

La veicolazione dei farmaci a livello del colon (figura 10) rappresenta un approccio attuale volto a migliorarne l'efficacia in seguito a somministrazione orale e può essere sfruttata con successo sia nel trattamento di patologie locali (sindrome dell'intestino irritabile, cancro al colon e malattie infiammatorie intestinali, tra cui il morbo di Crohn e la colite ulcerosa) per le quali è auspicabile il raggiungimento di elevate concentrazioni di principio attivo sul sito di azione, minimizzando gli effetti collaterali a carico del primo tratto dell'apparato gastro-intestinale, sia per incrementare i livelli sistemici di molecole scarsamente assorbite in seguito alla degradazione chimica ed enzimatica [Hanuer, S.B, 1996].



**Figura 10.** Anatomia del colon

La somministrazione di farmaci per via orale è considerata una via ottimale in quanto offre una maggiore *compliance* per il paziente, ma vi sono inconvenienti e barriere fisiologiche da superare.

Vi sono ad esempio alcuni farmaci che possono determinare irritazione della mucosa gastrica, come i salicilati che ad elevate concentrazioni possono provocare emorragie gastrointestinali. Altri farmaci invece non possono essere assunti per via orale in quanto verrebbero inattivati o degradati dagli enzimi del succo gastrico e/o dalla sua forte acidità.

Per superare questi problemi sono stati messi a punto sistemi di rilascio colon-specifici (CDDS- *colon specific drug delivery systems*) volti a migliorare e ad ottimizzare la somministrazione e l'assorbimento dei farmaci. Mediante la formazione di un sistema di rilascio al colon, è possibile somministrare per via orale farmaci che sono poco assorbiti nello stomaco o nell'intestino, come farmaci di origine peptidica e/o proteica, a causa delle elevate dimensioni, della natura idrofila e della suscettibilità alla degradazione chimica ed enzimatica che potrebbe avvenire nello stomaco, nel digiuno e nel duodeno. Il farmaco proteico verrebbe rilasciato nell'ileo o nel colon per passare poi alla circolazione sistemica [*Chourasia MK. and Jain S K., 2003; Haupt S. and Rubinstein A., 2002*].

I vantaggi offerti dal colon per un buon assorbimento di farmaci sono il valore di pH prossimo alla neutralità, la bassa quantità e attività di enzimi proteolitici presenti che potrebbero degradare il principio attivo e una migliore risposta all'assorbimento [*MacFarlane, G.T. et al., 1989*]. L'assorbimento dei farmaci è anche influenzato dalle caratteristiche dei farmaci stessi, quali il pKa e il grado di

ionizzazione, il tempo di residenza al colon in funzione della motilità del tratto gastrointestinale, la degradazione da parte degli enzimi batterici, il possibile legame del farmaco al muco, l'azione locale del farmaco, lo stato patologico, l'uso di promotori di assorbimento.

L'assorbimento dei farmaci al colon può avvenire per via paracellulare se la molecola in questione è di natura idrofila, e il passaggio si esplica attraverso le *tight junctions* fra le cellule, oppure, se la molecola è di natura lipofila, l'assorbimento avverrà per via transcellulare, ossia attraverso le cellule.

Il colon potrebbe non essere il sito migliore per l'assorbimento delle sostanze a causa dell'assenza dei villi intestinali che nel tenue sono responsabili della formazione di un'elevata superficie di assorbimento. Ma, il più lento transito lungo il colon, permette ai farmaci di rimanere a contatto con la mucosa del colon per un periodo maggiore di tempo rispetto a quanto possono stare nel tenue, grazie alla capacità del farmaco di instaurare legami con le proteine mucosali, garantendo così un assorbimento prolungato nel tempo.

Inoltre, in un paziente sano il muco e le membrane epiteliali rappresentano barriere fisiche cruciali per l'assorbimento delle proteine e dei peptidi dal lume intestinale verso la mucosa in quanto potrebbero non solo rallentare ma addirittura impedire l'assorbimento del principio attivo. Variazioni nello spessore delle membrane durante gli stati patologici possono avere importanti implicazioni per il *drug delivery* in questi siti, infatti la permeabilità della mucosa intestinale è aumentata in molti pazienti affetti dal morbo di Crohn, dalla malattia celiaca, da stati cancerosi, e da terapie a lungo termine a base di farmaci antinfiammatori non steroidei. Questa aumentata permeabilità

è da attribuirsi alla perdita delle *tight junctions* [Hollander D., 1999]. Ovviamente una rottura nella continuità della superficie epiteliale può offrire l'opportunità per un assorbimento diretto nel tessuto danneggiato di farmaci chemioterapici.

In tabella 1 sono riportati i farmaci maggiormente utilizzati in alcune patologie al colon, come la colite ulcerosa, la diarrea e il cancro al colon che sono candidati ideali per il rilascio colon-specifico.

**Tabella 1:** Farmaci più comuni usati per alcune patologie al colon e loro siti di azione

| Target sites    | Disease conditions   | Drug and active agents  |
|-----------------|--|---|
| Topical action  | Inflammatory Bowel Disease,<br>Irritable bowel disease and<br>Crohn's disease.<br>Chronic pancreatitis   | Hydrocortisone,<br>Budenoside,<br>Prednisolone, Sulfasalazine,<br>Olsalazine, Mesalazine,<br>Balsalazide. |
| Local action    | Pancreatactomy and cystic<br>fibrosis, Colorectal cancer   | Digestive enzyme<br>supplements<br>5-Fluorouracil   |
| Systemic action | To prevent gastric irritation<br>To prevent first pass<br>metabolism of orally ingested<br>drugs<br>Oral delivery of peptides<br>Oral delivery of vaccines | NSAIDS<br>Steroids<br><br>Insulin<br>Typhoid  |

Sono stati formulati diversi sistemi per il rilascio colon-specifico di farmaci, come i profarmaci macromolecolari, i polimeri pH-sensibili, sistemi di rilascio tempo-dipendenti e i sistemi di rilascio degradabili dalla microflora batterica.



### 1.3.1 Profarmaci macromolecolari

Un profarmaco macromolecolare è un composto farmacologicamente inattivo costituito da un *carrier* polimerico a cui è legato covalentemente un principio attivo, che per diventare attivo richiede una trasformazione enzimatica o spontanea *in vivo* che porta alla liberazione del farmaco. Il profarmaco per il rilascio al colon deve subire una minima idrolisi nella parte alta del tratto gastrointestinale e un'idrolisi più accentuata nel colon in cui rilascerà il farmaco.

L'uso dei profarmaci ha delle limitazioni rappresentate dalla disponibilità dei gruppi funzionali sulla molecola di farmaco richiesti per creare il legame chimico con il *carrier*. Inoltre i profarmaci, in quanto nuove entità chimiche, necessitano di un'attenta valutazione prima di essere usati come *carrier* [Sinha VR. and Kumria R., 2003].

### 1.3.2 Idrogeli pH-sensibili

Il valore di pH varia lungo il tratto gastrointestinale: nello stomaco il pH è compreso tra 1 e 2 durante lo stato di digiuno mentre aumenta dopo i pasti. Il pH diventa circa 6.5 nell'intestino tenue prossimale e circa 7.5-8 in quello tenue distale; dall'ileo al colon subisce una diminuzione, diventando 6.4 nel cieco e 5.7 nel colon ascendente. Nel colon discendente e trasverso esso diventa 6.6 e 7.0 rispettivamente.

Il valore di pH è soggetto a variazioni in funzione della dieta, dello stato di salute, e dalla presenza di cibo.

Il cambiamento del pH è stato usato per la creazione di sistemi di rilascio colon-specifici, che possono essere o pH sensibili, e quindi avere dei gruppi funzionali tali che si ionizzano al valore di pH intestinale con conseguente *swelling* della matrice e rilascio del

farmaco oppure essere costituiti da un rivestimento che resta integro al pH gastrico ma che si dissolve al pH intestinale.

Un esempio di idrogel pH-sensibile per un potenziale *drug delivery* al colon, è dato da un idrogel composito, formato da un derivato metacrilato e succinico del destrano e da un derivato metacrilato e succinico della poli(N-2-idrossietil)-DL-aspartammide, ottenuto mediante reticolazione UV-indotta. Studi di rilascio *in vitro*, condotti utilizzando il 2-metossiestradiolo come farmaco modello, mostrano che l'idrogel ottenuto rimane intatto nella parte superiore del tratto gastrointestinale, ed è capace di rilasciare il farmaco nel fluido intestinale simulato, grazie allo *swelling* pH-sensibile e alla degradabilità della componente polisaccaridica, ad opera delle destranasi, enzimi specifici a livello del colon [Casadei M.A. *et al.*, 2008].

### 1.3.3 Sistemi di rilascio tempo-dipendenti

Il tempo di transito lungo il tratto gastrointestinale è stato usato per formulare sistemi in cui il rilascio del farmaco venga ritardato al tempo richiesto per il transito dalla cavità buccale alla parte distale del piccolo intestino, cioè all'ileo e successivamente al colon in cui avviene il rilascio.

La maggiore limitazione per questi sistemi è che *in vivo* la variazione del tempo di transito non può accuratamente predire il tempo di arrivo al colon, risultando in una bassa biodisponibilità del farmaco.

Fattori influenzanti il tempo di transito della forma di dosaggio nelle varie regioni del tratto gastrointestinale dipendono dalla dieta, dalla motilità intestinale, dall'attività fisica della persona e dallo stato di

digiuno. Ad esempio, il tempo di svuotamento gastrico varia da 1 a 10 ore a seconda se il farmaco è assunto prima o dopo i pasti. Il tempo di transito nel piccolo intestino è invece costante ed è circa 3-4 ore, ma è funzione dello stato fisiologico e delle dimensioni della forma di dosaggio. Lo stato fisiopatologico di un individuo può influenzare la *performance* di questi sistemi tempo-dipendenti. Per esempio, pazienti affetti dalla sindrome del colon irritabile e da colite ulcerosa mostrano un transito accelerato lungo l'intero colon.

#### **1.3.4 Sistemi di rilascio degradabili dalla microflora batterica**

La microflora batterica è ampiamente presente nel colon in concentrazioni espresse come *Colony Forming Unit* (CFU) comprese tra  $10^{11}$ - $10^{12}$  CFU/ml e consiste principalmente di batteri anaerobici quali Bacteroidi, Bifidobatteri, Eubacteri, Clostridia, Enterococchi, Enterobacteria [Vassallo M. et al., 1992; Jain A. et al., 2006].

Questa abbondante microflora trae energia dalla fermentazione di vari tipi di substrati che rimangono indigeriti nel piccolo intestino, quali i di- e i tri- saccaridi e i polisaccaridi [Rubinstein A., 1990]. Essa produce un vasto numero di enzimi idrolitici tra cui le glucuronidasi, le xylosidasi, l'arabinosidasi, le galattosidasi, le nitroriduttasi e le deaminasi [Kinet R. et al., 1998]. A causa della presenza di questo tipo di enzimi nel colon, l'uso di polimeri biodegradabili sembra essere un approccio più promettente per il rilascio di farmaci colon-specifico [Basit A. and Bloor J., 2003], in quanto essi devono proteggere il farmaco dall'ambiente ostile dello stomaco e dell'intestino e rilasciarlo nel colon, dove verranno degradati dagli

enzimi con conseguente riduzione del loro peso molecolare e perdita nella resistenza meccanica e rilascio del farmaco [Swift G., 1992].

I profarmaci e le matrici polimeriche contenenti legami azoaromatici sono esempi di sistemi potenzialmente degradabili da enzimi riduttivi rilasciati dai batteri del colon [Jain A. *et al.*, 2006]. Oltre le azoreduttasi, altri enzimi coinvolti nella scissione delle matrici per il rilascio dei farmaci sono le polisaccaridasi come le glicosidasi, le inulinasi, le destranasi, le ialuronidasi.

### **1.3.5 Polimeri utilizzati per i *Colon Drug Delivery Systems***

Per la formazione dei CDDS sono stati impiegati diversi polimeri sia naturali che sintetici. In entrambi i casi, i polimeri e i loro prodotti di degradazione non devono essere tossici per l'ospite, devono essere biocompatibili e non immunogenici.

#### ***1.3.5.1 Polisaccaridi naturali***

Tra i polimeri naturali utilizzati per la produzione di CDDS, rivestono una grande importanza i polisaccaridi, ovvero polimeri di monosaccaridi o disaccaridi legati tramite legami glicosidici. Si trovano abbondanti in natura, sono idrofili, altamente stabili, non tossici, biocompatibili e biodegradabili, e, possono essere modificati chimicamente [Hovgaard L. and Brondsted H., 1996].

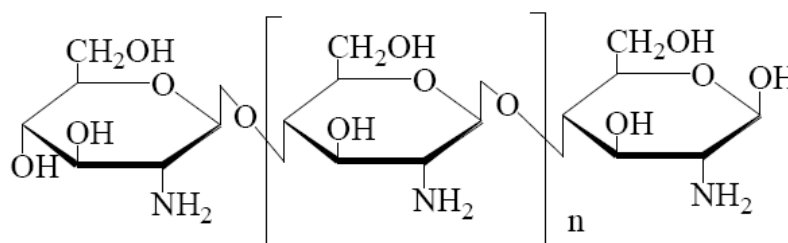
Molti polisaccaridi vengono degradati dalla microflora colonica a saccaridi semplici, ma alcuni, a causa della loro elevata solubilità in acqua, rigonfiano nel tratto superiore del GIT e questa elevata idrofilia può provocare il rilascio prematuro del farmaco. Per superare tale problema, i polisaccaridi naturali possono essere modificati

chimicamente o miscelati con polimeri idrofobi insolubili in acqua allo scopo di limitare il rigonfiamento nella parte superiore del GIT e di consentire il rilascio del farmaco nel colon in seguito ad idrolisi del legame glicosidico.

Tra i polisaccaridi usati per la formazione dei CDDS vi sono il chitosano, la gomma guar, gli alginati, i destrani, l'amilosio e l'inulina.

- ***Chitosano***

Il chitosano è un polisaccaride policationico ad elevato peso molecolare, derivante dalla chitina mediante deacetilazione alcalina. È un copolimero di N-acetil-D-glucosammina e di D-glucosammina legate mediante legami  $\beta$ -(1,4)-glicosidici (figura 11).



**Figura 11.** Struttura chimica del chitosano

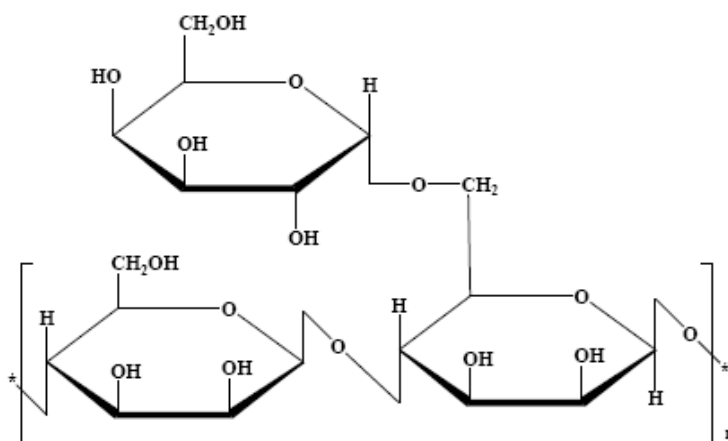
Il chitosano presenta buone proprietà biologiche, come la biodegradabilità e la biocompatibilità, può essere degradato in chitooligosaccaridi dalle chitinasi, dal lisozima e da enzimi non-specifici come le proteasi, le lipasi e la pepsina.

Il chitosano è solubile in ambiente acido, e precipita a pH 7. Pertanto, il suo uso in sistemi di rilascio al colon prevede un rivestimento enterico che lo protegga dall'acidità dello stomaco oppure una

modifica mediante un legame con un polimero sintetico o con altri polisaccaridi naturali per dargli resistenza alla degradazione nell'ambiente acido. Appena la formulazione raggiunge l'intestino dove il pH aumenta, lo strato enterico si dissolve liberando il farmaco rivestito da chitosano. Sono stati preparati una varietà di sistemi a base di chitosano, quali capsule, compresse, microparticelle, nanoparticelle, film, contenenti farmaci quali antiinfiammatori da veicolare e rilasciare nel colon [Oriente *I. et al.*, 2002; Friend, D.R., 2005].

- **Gomma guar**

La gomma guar deriva dai semi di *Cyamopsis tetragonolobus*, è un polisaccaride naturale del galattomanno avente alto peso molecolare. È composto da catene lineari di unità di  $\beta$ -(1-4)-D-mannopiranosio legate a unità di  $\alpha$ -(1-6)-D-galattopiranoil in rapporto (1:2) (figura 12).



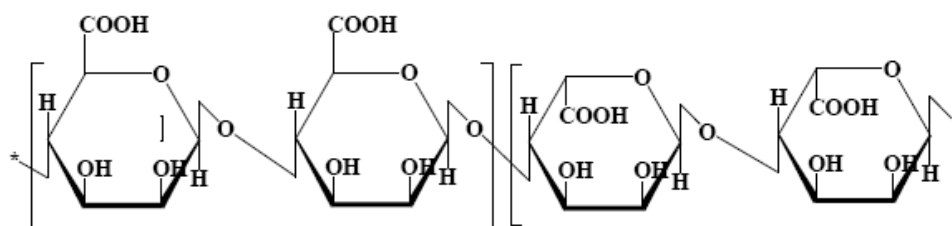
**Figura 12.** Struttura chimica della gomma guar

Il pH di una soluzione acquosa di gomma guar all'1% (w/v) varia da 5 a 7, e la soluzione rimane stabile per diversi valori di pH. Nelle formulazioni farmaceutiche la gomma guar è usata come legante,

disgregante, sospendente e agente stabilizzante [Guo *et al.*, 1998]. La gomma guar ha un peso molecolare di circa 1 000000 Da e quindi in soluzione acquosa forma delle soluzioni altamente viscosi. Queste proprietà gelificanti ritardano il rilascio del farmaco dalla forma di dosaggio e grazie alla suscettibilità alla degradazione ad opera di microorganismi presenti nel grande intestino, essa può essere impiegata nella formazione di sistemi di rilascio sostenuto di farmaci al colon.

- **Alginati**

Gli alginati sono polisaccaridi lineari costituiti da unità ripetitive di acido  $\alpha$ -L-glucuronico e acido  $\beta$ -D-mannuronico arrangiati a blocchi o con distribuzione *random* (figura 13).

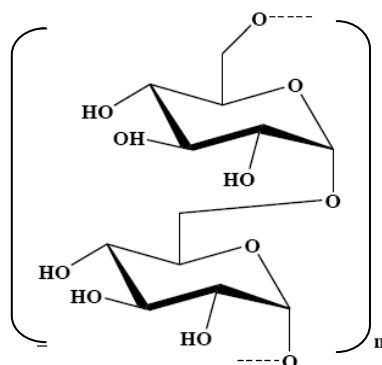


**Figura 13.** Struttura chimica degli alginati

Nei prodotti commerciali, i gruppi carbossilici si presentano in forma sodica, in cui sono più solubili in acqua rispetto alla forma non salificata. L'aggiunta di ioni  $\text{Ca}^{+2}$  o  $\text{Ba}^{+2}$  ad una soluzione del polimero, determina la gelificazione del sistema a seguito della complessazione del catione con i gruppi carbossilato e ossidrilici del polimero [Liu P. and Krishnan T.R., 1999].

- **Destrani**

I destrani sono una classe di polisaccaridi possedenti un *backbone* polimerico lineare costituiti da unità di D-glucosio legate con legami  $\alpha$ -(1-6)-D-glicosidici (figura 14).



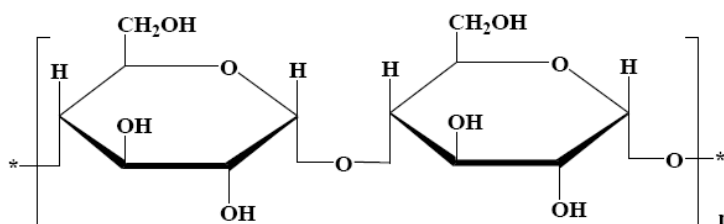
**Figura 14.** Struttura chimica del destrano

Il destrano rimane integro in condizioni acide o basiche ma può essere digerito dalle destranasi presenti nel colon, e grazie alla sua biodegradabilità può essere usato per preparare CDDS [Mehvar, 2000]. Profarmaci costituiti da molecole di farmaco legati al destrano rimangono inattivi e non sono assorbiti dallo stomaco e dal piccolo intestino ma quando giungono nel colon le destranasi scindono i legami glicosidici del destrano e liberano il farmaco [Harboe E. et al., 1989].

- **Amilosio**

L'amilosio è un polisaccaride estratto dalle piante e consiste di residui di D-glucopiranosio legati mediante legami  $\alpha$ -(1-4) (figura 15).





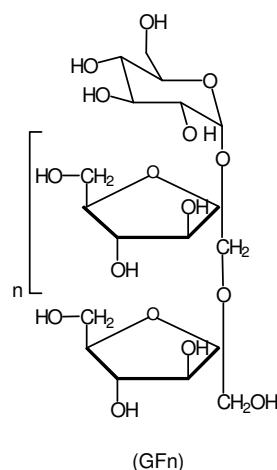
**Figura 15.** Struttura chimica dell'amilosio

Ha la capacità di formare film che swellano in acqua e sono resistenti all' $\alpha$ -amilasi pancreatica [Englyst H.N. et al., 1986] ma possono essere degradati dai batteri colonici. Quindi l'amilosio si offre come un buon candidato per i CDDS.

Tuttavia i rivestimenti polimerici costituiti solo da amilosio in condizioni gastrointestinali diventano porosi e rilasciano il farmaco. Per evitare che ciò avvenga, si possono inserire nei rivestimenti polimeri insolubili per controllare il grado di rigonfiamento dell'amilosio. Miscele di amilosio ed etilcellulosa utilizzate come rivestimento e conosciute come *Ethocel* hanno mostrato grandi potenzialità come *carrier* per il rilascio colon specifico in quanto sono resistenti all'ambiente gastrico e all'ambiente del piccolo intestino ma sono suscettibili di attacco enzimatico nel colon [Cummings, J.H. et al., 1996].

- ***Inulina***

L'inulina è un polisaccaride naturale estratta da diverse piante tra cui la cicoria, consiste di catene lineari di residui di fruttosio legati mediante legami  $\beta$ -2,1 e termina con un residuo di glucosio in forma piranosica all'estremità riducente [Van Loo et al., 1995] (figura 16).



**Figura 16.** Struttura chimica dell'inulina

L'inulina non viene idrolizzata dalle secrezioni del tratto digerente ma degradata da batteri presenti nel colon come i bifidobatteri [Kruse *et al.*, 1999].

Il peso molecolare medio del polimero, che dipende dalla fonte di estrazione, è in genere compreso tra 5600 e 6300 Da a seconda del grado di polimerizzazione.

La solubilità in acqua dipende dalla temperatura, dal grado di polimerizzazione, dalla distribuzione molecolare e dal grado di ramificazione delle catene. Quindi ci saranno porzioni più solubili a basse temperature (20°C) e porzioni solubili a temperature più elevate (60-70°C). In genere come temperatura per la solubilità dell'inulina si considera 60°C.

L'inulina viene degradata nel colon ad opera delle inulinasi derivanti da *Aspergillus Niger*, con produzione di gas (CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>), L(+)-lattato e acidi grassi a catena corta (SCFA) quali acetato, propionato e butirato [Kleessen B. *et al.*, 1997].

Mediante l'azione degli SCFA, l'inulina può svolgere diversi effetti benefici per l'organismo: può influenzare l'assorbimento del glucosio poichè il propionato inibisce la gluconeogenesi e stimola la glicolisi [Wolever T., 1995], mentre l'acetato ha effetti opposti [Remesy C., 1992]; può stimolare l'assorbimento di acqua e di sodio minimizzando gli effetti della diarrea, può aumentare la motilità dell'ileo e la proliferazione delle cellule intestinali, e poichè gli SCFA sono assorbiti attraverso le cellule epiteliali del colon si trasformano in una fonte di energia per l'ospite; possono inoltre migliorare l'assorbimento metabolico nel colon di minerali quali il calcio, il magnesio ed il ferro. A livello sistemico, sempre mediante l'azione degli SCFA, l'inulina riduce i livelli di colesterolo e aumenta i livelli di lipoproteine ad alta densità (HDL).

La presenza di Bifidobatteri, il cui sviluppo è stimolato dall'inulina, e la riduzione del pH luminale in seguito a produzione degli SCFA, hanno un effetto di prevenzione sulla carcinogenesi nel colon ma può inoltre migliorare le disfunzioni gastrointestinali (ulcere peptiche, gastrite, colon irritabile).

L'inulina è classificata come fibra dietetica per i suoi effetti positivi sull'organismo e per le sue proprietà nutrizionali è detta "alimento fisiologicamente funzionale".

Inoltre poiché passa liberamente il filtro glomerulare e non viene né riassorbita né secreta, viene usata per la determinazione della *clearance* renale.

La biocompatibilità dell'inulina è stata testata mediante test *in vitro* ed *in vivo*, ed è stato inoltre evidenziato che i frammenti di inulina possono avere effetti benefici su patologie dell'intestino, possono

promuovere la proliferazione dei bifidobatteri e aumentare la composizione della microflora colonica [Wang X. and Gibson G.R., 2008].

Sono stati preparati diversi idrogeli a base di inulina come potenziali *carrier* di farmaci per il rilascio al colon [Maris B. et al., 2001].

Un esempio sono gli idrogeli a base di inulina derivatizzata con divinil sulfone e anidride succinica (INUDVSA) e reticolata con il trimetilolpropane tris (3-mercaptopropionate) [Pitarresi et al, 2008 (A)]. La compatibilità di tali idrogeli è stata valutata mediante test sulle Caco-2, ed è stato trovato che gli idrogeli a base di inulina hanno una buona compatibilità cellulare, infatti, sia essi che i loro prodotti di degradazione, non causano significative variazioni nella vitalità cellulare dopo diretto contatto con le cellule.

#### **1.3.5.2 Polimeri sintetici**

I polimeri sintetici sono disponibili in un'ampia varietà di strutture chimiche grazie alla possibilità di sintetizzarli con le proprietà desiderate in funzione del loro utilizzo. Molti polimeri sintetici sono stati proposti per la produzione di CDDS come gli azopolimeri, i derivati della cellulosa, i polimeri acrilici e i poliamminoacidi.

L'impiego dei poliamminoacidi nella formazione di nuovi *drug delivery systems* si attribuisce alle loro interessanti proprietà strutturali, in quanto possiedono una struttura proteino-simile e possono essere considerati un giusto compromesso tra macromolecole naturali e sintetiche, essendo biocompatibili e potenzialmente biodegradabili come le prime, ma con il vantaggio di possedere un arrangiamento più regolare e una varietà di residui amminoacidici più

piccola rispetto alle proteine naturali. Grazie alle tecniche di polimerizzazione può essere progettata e sintetizzata una grande varietà di poliamminoacidi con opportuno peso molecolare, biodegradabili o contenenti specifici gruppi funzionali utili per eventuali funzionalizzazioni chimiche al fine di preparare derivati dotati di specifiche proprietà.

## 2. SCOPO DELLA TESI

Allo scopo di ottenere nuovi *drug delivery systems*, il presente lavoro di tesi di dottorato di ricerca è stato incentrato sulla sintesi e la caratterizzazione chimico-fisica di derivati polimerici di natura poliamminoacidica e/o polisaccaridica per la produzione di nuovi sistemi, quali micelle polimeriche ed idrogeli utilizzabili rispettivamente per la veicolazione di farmaci lipofili per via parenterale e per il rilascio di farmaci a livello del colon.

In particolare, sono stati utilizzati due polimeri biocompatibili di diversa natura chimica: una poliaspartammide (PHEA) e l'inulina (INU), un polisaccaride del fruttosio, naturale e specificatamente degradato nel colon ad opera delle inulinasi.

L' $\alpha,\beta$ -poli(N-2-idrossietil)-D,L-aspartammide (PHEA) è un polimero di sintesi a struttura poliamminoacidica, biocompatibile, non tossico, non teratogeno, non immunogenico e dotato di elevata solubilità in acqua (figura 17) [Giammona G. et al., 1987].

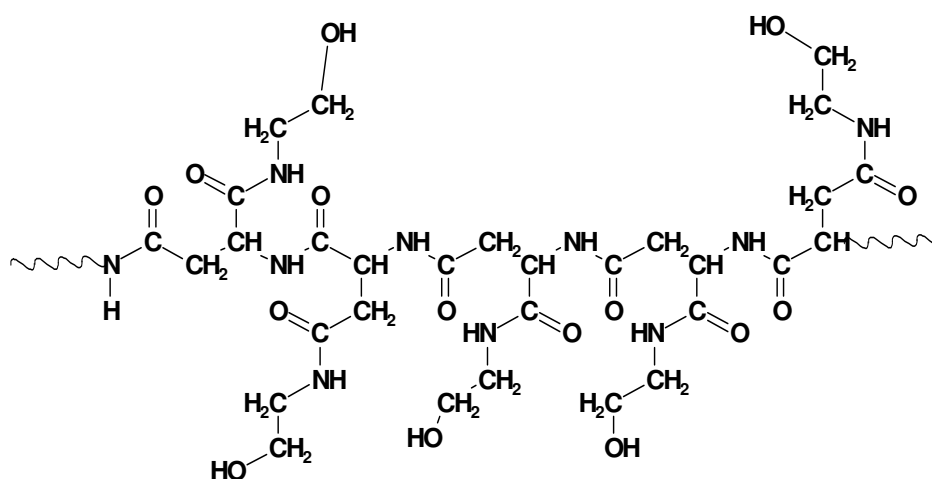


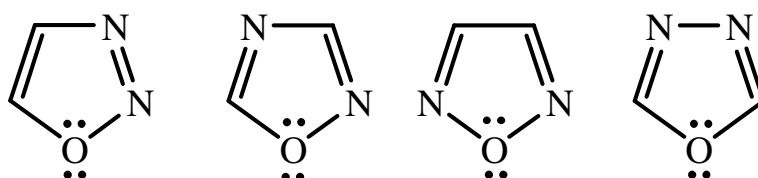
Figura 17. Struttura chimica del PHEA

Mediante i gruppi ossidrilici presenti in catena laterale, è possibile legare covalentemente al *backbone* polimerico molecole di varia natura quali spaziatori, agenti direzionanti, principi attivi e altre catene polimeriche.

Nel presente lavoro di tesi il PHEA è stato parzialmente funzionalizzato con l'O-(2-amminoetil)-O-metilpolietileneglicole avente peso molecolare pari a 2000 Da (PEG<sub>2000</sub> -NH<sub>2</sub>). L'utilizzo del PEG è rivolto all'ottenimento di un idoneo rapporto tra porzione idrofila e porzione idrofoba dei copolimeri stessi, al fine di ottenere derivati anfifilici che siano in grado di auto-aggregarsi in fase acquosa.

La porzione idrofoba presente nei polimeri oggetto di studio è rappresentata da anelli 1,2,4-ossadiazolici fluorurati.

Gli ossadiazoli sono eterocicli aromatici a cinque termini con due atomi di azoto, un atomo di ossigeno e due atomi di carbonio, e possono esistere nelle quattro forme isomere mostrate in figura 18.



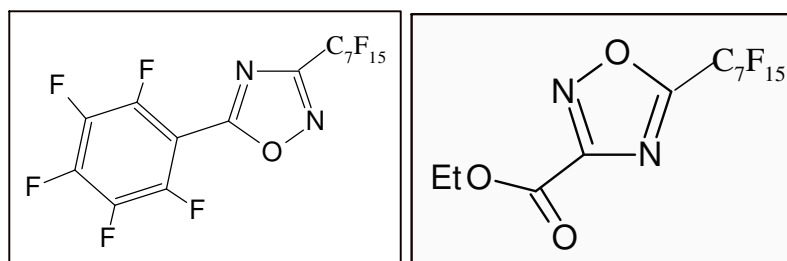
**Figura 18.** Isomeri dell'ossadiazolo, rispettivamente: 1,2,3-, 1,2,4-, 1,2,5- e 1,3,4-ossadiazolo

In particolare, gli 1,2,4-ossadiazoli sono eterocicli pentatomici elettron poveri e scarsamente aromatici. Il carattere elettron povero del sistema eterociclico è esaltato dalla funzionalizzazione con sostituenti fortemente elettron attrattori, quali gruppi perfluoroalchilici o

polifluoroarilici, aumentandone così il carattere 1,4-dielettrofilo e, quindi, la predisposizione alle reazioni di sostituzione nucleofila.

La presenza di numerosi atomi di fluoro consente l'instaurarsi di interazioni favorevoli con altre molecole fluorurate, e conferisce proprietà idrofobiche all'ossadiazolo.

Per favorire il legame dell'ossadiazolo fluorurato al copolimero PHEA-PEG<sub>2000</sub>, è stata incrementata la reattività del copolimero stesso mediante reazione con l'etilendiammina (EDA), introducendo funzioni amminiche, più reattive rispetto ai gruppi ossidrilici del PHEA. Il copolimero PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA così ottenuto è stato fatto reagire separatamente con i due ossadiazoli fluorurati, il 5-pentafluorofenil-3-perfluoroetil-1,2,4-ossadiazolo (PPOX) e il 3-carbossietil-5-perfluoroetil-1,2,4-ossadiazolo (CPOX) mostrati in figura 19.



**Figura 19.** Strutture degli 1,2,4-ossadiazoli fluorurati impiegati nella sintesi dei copolimeri PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX e PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX.

A sinistra: 5-pentafluorofenil-3-perfluoroetil-1,2,4-ossadiazolo (PPOX). A destra: 3-carbossietil-5-perfluoroetil-1,2,4-ossadiazolo (CPOX)

Sono stati ottenuti i copolimeri PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX e PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX a diverso contenuto in ossadiazolo fluorurato, che sono stati caratterizzati mediante FT-IR, <sup>19</sup>F-NMR e analisi SEC.



L'importanza dei polimeri fluorurati risiede nel possedere particolari caratteristiche quali alta stabilità chimica, termica e ossidativa, elevata resistenza alle radiazioni luminose, basso coefficiente di attrito, basso indice di rifrazione, idrorepellenza e soprattutto, bassa tensione superficiale. L'introduzione di porzioni idrofile in una catena perfluoroalchilica porta alla formazione di tensioattivi fluorurati [Kirsch P., 2004] in cui, le forti interazioni idrofobiche e le basse interazioni di Van der Waals delle catene fluorurate determinano un aumento della capacità di autoaggregazione in acqua dei fluoropolimeri anfifilici: essi, infatti, possiedono una concentrazione di aggregazione critica (CAC) più bassa in confronto ai rispettivi analoghi idrogenati, con un valore di CAC di due ordini di grandezza inferiore rispetto agli analoghi idrogenati [Shinoda K. et al., 1972].

Dati i vantaggi offerti dalle caratteristiche dei polimeri fluorurati, è stata valutata la capacità dei derivati PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX e PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX a più alto contenuto in ossadiazolo fluorurato di generare aggregati micellari in fase acquosa e di solubilizzare un farmaco fluorurato poco solubile, quale la flutamide, un agente antitumorale utilizzato nel trattamento del carcinoma alla prostata.

È stata inoltre valutata la stabilità delle micelle sia in plasma che in condizioni fisiologiche simulate a pH 7.4 ed infine, l'attività antitumorale della flutamide micellizzata rispetto alla forma libera è stata studiata *in vitro* sulle cellule di carcinoma prostatico LNCaP (*lymphnode metastatic lesion of human prostatic adenocarcinoma*).

L'inulina (vedi figura 16), polisaccaride scelto in quanto naturale, biocompatibile, biodegradato in modo specifico nel colon, non tossico ed economico, è stata utilizzata allo scopo di creare nuove matrici idrogel potenzialmente utilizzabili per incorporare e rilasciare agenti attivi in un preciso distretto dell'organismo, in particolare nelle porzioni più basse dell'intestino, quali il colon (grazie all'azione delle inulinasi), in seguito ad una somministrazione per via orale.

Diversi studi hanno dimostrato che i prodotti di degradazione dell'inulina hanno un ruolo benefico nelle malattie infiammatorie dell'intestino. In questo modo l'inulina potrebbe avere una duplice funzione: sia come *carrier* sia come polimero attivo nella riduzione dell'infiammazione [Tripodo G. et al., 2005; Mooter G.V.d. et al., 2003].

Nel presente lavoro di tesi, l'inulina è stata funzionalizzata con anidride metacrilica (MA) e anidride succinica (SA) per ottenere il derivato INUMASA contenente insaturazioni utili alla produzione di idrogeli per fotoreticolazione e funzionalità acide che rispondono a variazioni di pH. Inoltre, grazie alla presenza dell'inulina, tali idrogeli risultano essere potenzialmente degradabili a livello del colon ad opera delle inulinasi.

Il derivato INUMASA è stato utilizzato in combinazione con un derivato poliamminiacidico per l'ottenimento di idrogeli compositi mediante irraggiamento UV.

La preparazione di materiali compositi, dà l'opportunità di ottenere sistemi con caratteristiche chimico-fisiche vantaggiose, così come un accettabile grado di degradazione, un appropriato grado di *swelling*, resistenza meccanica e idrolitica, comportamento bioadesivo.

Tutte queste proprietà possono essere modulate in funzione di specifiche necessità biologiche o farmaceutiche che devono essere soddisfatte scegliendo, per esempio, un'adeguata combinazione di componenti polisaccaridici e poliamminoacidici. Quindi, la combinazione di una macromolecola naturale, come un polisaccaride, con un polimero sintetico, come un poliamminoacido, dà l'opportunità di porre insieme la biocompatibilità tipica di un polimero naturale con le favorevoli proprietà di un polimero sintetico così come versatilità chimica, proprietà meccaniche, facilità nella preparazione e bassi costi di produzione.

Il poliamminoacido scelto è stato il PHM, un derivato metacrilato del PHEA ottenuto mediante reazione con anidride metacrilica e caratterizzato dalla presenza in catena laterale di gruppi funzionali vinilici che rendono il polimero suscettibile di fotoreticolazione UV.

Pertanto, idrogeli a base di INUMASA e PHM sono stati ottenuti mediante irradiazione UV, per un breve tempo, alla lunghezza d'onda di 366 nm e senza l'uso di iniziatori radicalici, in presenza o in assenza di polietilenglicoldimetacrilato con PM 550 Da (PEGDM<sub>550</sub>).

Tali idrogeli sono stati impiegati per la veicolazione ed il rilascio per via orale di proteine, e in particolare dell'immunoglobulina IgG, scelta come modello di proteine terapeutiche quali gli anticorpi monoclonali anti-TNF $\alpha$ , usate nella cura del morbo di Chron.

L'impiego di anticorpi come agenti terapeutici presenta tre problemi principali: l'instabilità sia fisica che chimica, la difficoltà nel preparare le forme di dosaggio e gli effetti sistemici se applicati per via endovenosa.

Per tali ragioni sarebbe conveniente il trattamento della malattia (morbo di Crohn) a livello locale. In effetti, in recenti studi, iniezioni locali subcutanee di anticorpi monoclonali anti – TNF $\alpha$ , in pazienti affetti da morbo di Crohn, hanno portato ad una significativa recessione delle lesioni ulcerose [Biancone L. et al., 2006]. In tal senso il rilascio locale di anticorpi monoclonali mediante l'uso di idrogel, potrebbe essere un'ottima strategia per il trattamento di ulcere al colon indotte dal morbo di Crohn.

Nel presente lavoro di tesi di dottorato, l'inulina è stata inoltre utilizzata per preparare nuovi idrogeli in grado di veicolare a livello intestinale farmaci lipofili (flutamide) per garantirne un rilascio prolungato ed evitare multiple somministrazioni giornaliere di farmaco.

L'inulina è stata derivatizzata con il divinilsulfone (DV) ottenendo il derivato divinilsulfonico (INUDV) capace di reagire con O,O'-Bis(2-aminoetil)polietileneglicole (PEGBa) per l'ottenimento di idrogeli chimici.

Il PEGBa è stato scelto come agente di *crosslinking* biocompatibile, e la reazione tra INUDV e PEGBa è stata condotta in soluzione tampone fosfato (PBS) pH 7.4 a temperatura ambiente per 4 ore in assenza di iniziatori radicalici. Questi idrogeli sono stati preparati variando la quantità di PEGBa che reagisce con il derivato INUDV, e sono stati caratterizzati riguardo la loro capacità di *swelling* in ambiente acquoso, la suscettibilità all'idrolisi chimica ed enzimatica, l'analisi dimensionale, le proprietà mucoadesive e la biocompatibilità su cellule Caco-2.

Considerate le buone proprietà degli idrogeli ottenuti, è stato scelto il derivato contenente la maggiore quantità di PEGBa come sistema per la veicolazione di farmaci per via orale ed in particolare di farmaci idrofobici quali la flutamide, allo scopo di fornire con un'unica somministrazione giornaliera un profilo di rilascio prolungato, evitando di ricorrere a tre somministrazioni al giorno, come avviene con la terapia convenzionale.

Il caricamento del farmaco, a causa della sua bassa solubilità in acqua, è stato effettuato mediante impregnazione e il profilo di rilascio del farmaco è stato studiato sia in ambiente gastrico simulato (pH 1.0) che in ambiente intestinale simulato (pH 6.8). L'andamento del rilascio dall'idrogel è stato comparato con la dissoluzione del farmaco libero e con la dissoluzione della compressa presente in commercio.

Sono in corso studi di biodisponibilità *in vivo* sui cani, allo scopo di confrontare la concentrazione ematica raggiunta dalla flutamide rilasciata dalla forma farmaceutica commerciale (compressa) rispetto alla concentrazione raggiunta dallo stesso farmaco rilasciato dalla matrice di INUDV/PEGBa.

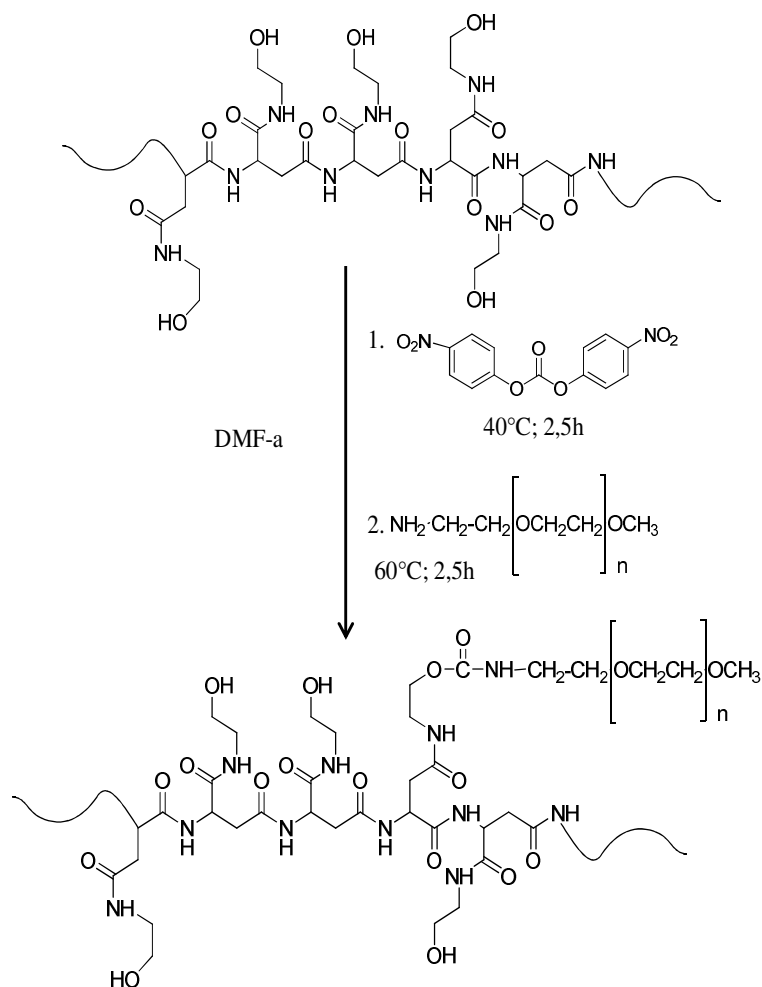
### **3. RISULTATI E DISCUSSIONE**

#### **3.1 SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DI COPOLIMERI FLUORURATI A BASE DI PHEA PER LA VEICOLAZIONE DI FARMACI LIPOFILI**

##### **3.1.1 Sintesi e caratterizzazione del copolimero PHEA-PEG<sub>2000</sub>**

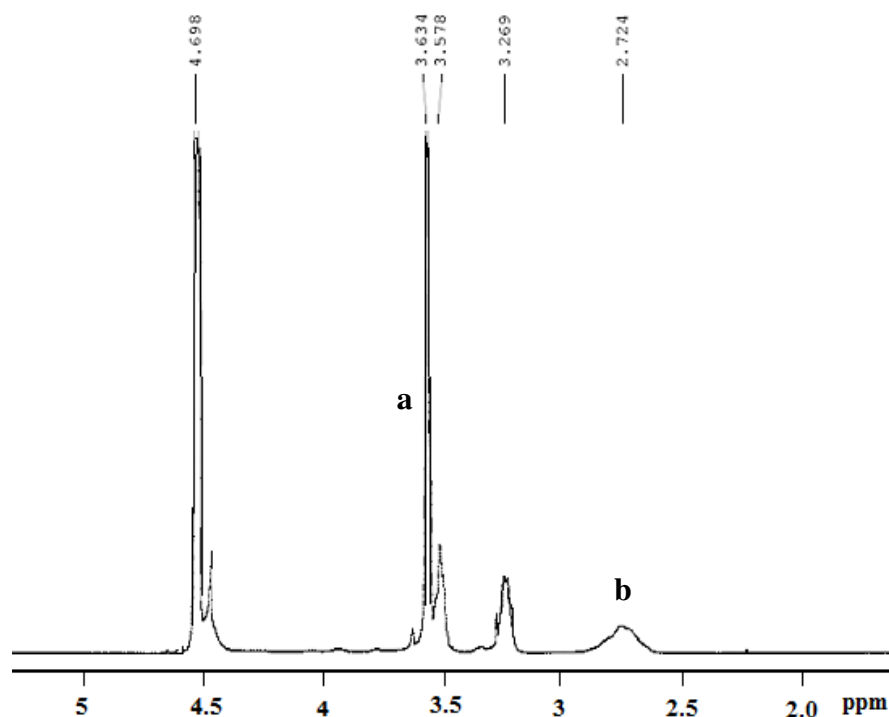
Il derivato peghilato del PHEA è stato ottenuto mediante reazione del PHEA con l'O-(2-amminoetil)-O'-metil polietileneglicole avente peso molecolare pari a 2000 Da (PEG<sub>2000</sub>-NH<sub>2</sub>), utilizzando il bis(4-nitrofenil)carbonato (PNFC) per attivare i gruppi ossidrilici del PHEA ed aumentare in tal modo la reattività nei confronti dei gruppi amminici del PEG<sub>2000</sub>-NH<sub>2</sub>.

La procedura di sintesi e la struttura del copolimero ottenuto sono mostrate nello schema 1.



**Schema 1.** Rappresentazione schematica della sintesi del PHEA-PEG<sub>2000</sub> (n=44)

Il copolimero PHEA-PEG<sub>2000</sub> è stato ottenuto con una resa pari al 95% p/p, rispetto al PHEA di partenza. L'avvenuto legame del PEG<sub>2000</sub>-NH<sub>2</sub> al *backbone* polimerico del PHEA è stato confermato mediante analisi <sup>1</sup>H-NMR e FT-IR.

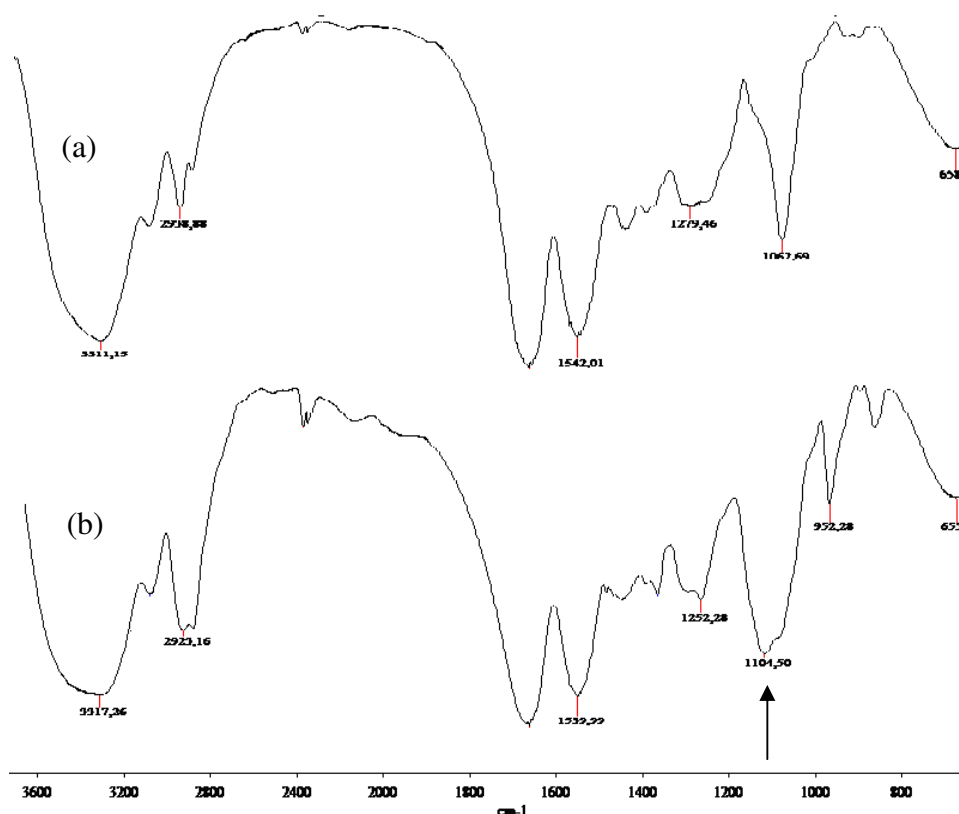


**Figura 20.** Spettro  $^1\text{H}$ -NMR del PHEA-PEG<sub>2000</sub>

L'analisi  $^1\text{H}$ -NMR (figura 20), condotta solubilizzando il PHEA-PEG<sub>2000</sub> in  $\text{D}_2\text{O}$ , ha rivelato un grado di derivatizzazione (DD) in PEG<sub>2000</sub>-NH<sub>2</sub> pari al  $4.0 \pm 0.5\%$  in moli rispetto alle moli di unità ripetitive di PHEA, calcolato paragonando l'integrale del picco relativo ai protoni a 3.634  $\delta$  attribuiti ai  $-(\text{CH}_2\text{-}\mathbf{\text{CH}_2}\text{-O})_n\text{-}$  del PEG<sub>2000</sub>-NH<sub>2</sub> (segnale **a** nello spettro) con l'integrale del picco relativo ai protoni a 2.724  $\delta$  attribuiti ai  $-(\text{CO-CH-}\mathbf{\text{CH}_2}\text{-CO-NH})\text{-}$  del PHEA (segnale **b** nello spettro).

Lo spettro FT-IR (KBr) (figura 21) mostra la comparsa di una banda a  $1104.5\text{ cm}^{-1}$  relativa allo *stretching* del legame C-O, assente nel PHEA di partenza e, dunque, identificativa dell'avvenuto legame del PEG<sub>2000</sub>-NH<sub>2</sub> al PHEA.





**Figura 21.** Confronto degli spettri FT-IR del PHEA (a) e del PHEA-PEG<sub>2000</sub> (b)

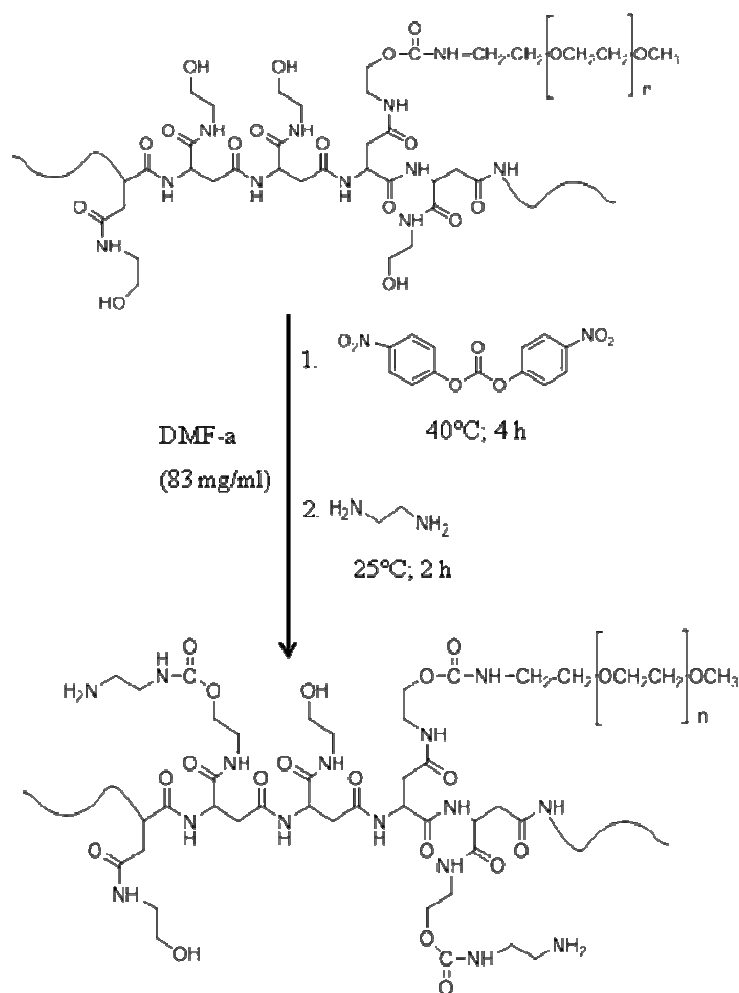
La determinazione del peso molecolare medio del PHEA-PEG<sub>2000</sub> è stata effettuata mediante analisi SEC condotta in DMF, e ha rilevato un valore pari a 62.3 kDa, con un indice di polidispersità pari a 1.83, evidenziando un incremento di peso molecolare rispetto al PHEA di partenza (40.5 kDa).

### 3.1.2 Sintesi e caratterizzazione del copolimero PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA

Al fine di incrementare la reattività del copolimero nei confronti degli ossadiazoli fluorurati PPOX e CPOX, sono state introdotte all'interno del copolimero PHEA-PEG<sub>2000</sub> ( $DD_{\text{PEG}_{2000}-\text{NH}_2} = 4.0 \pm 0.5\%$  in moli) funzioni amminiche mediante reazione con etilendiammina (EDA), maggiormente reattive verso gli ossadiazoli fluorurati, rispetto ai

gruppi ossidrilici del PHEA. La reazione è stata condotta in DMF anidra, utilizzando il PNFC come agente attivante dei gruppi ossidrilici del PHEA, in modo da incrementare la reattività verso i gruppi amminici dell'EDA, portando così all'introduzione, all'interno del copolimero, di un legame carbammico, tra il PHEA attivato e l'EDA.

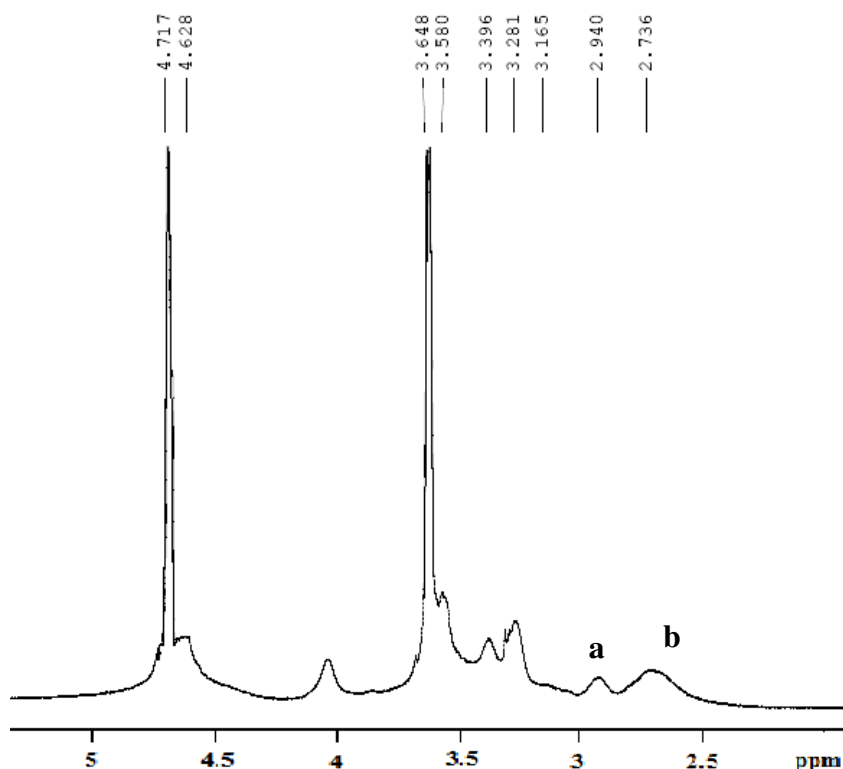
Il prodotto è stato ottenuto con una resa pari al 90% p/p, rispetto al PHEA-PEG<sub>2000</sub> di partenza. La procedura di sintesi e la struttura del copolimero ottenuto sono mostrate nello schema 2.



**Schema 2.** Schema di sintesi del copolimero PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA (n=44)

Dopo opportuna purificazione, il copolimero PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA è stato caratterizzato mediante analisi <sup>1</sup>H-NMR, FT-IR e SEC.

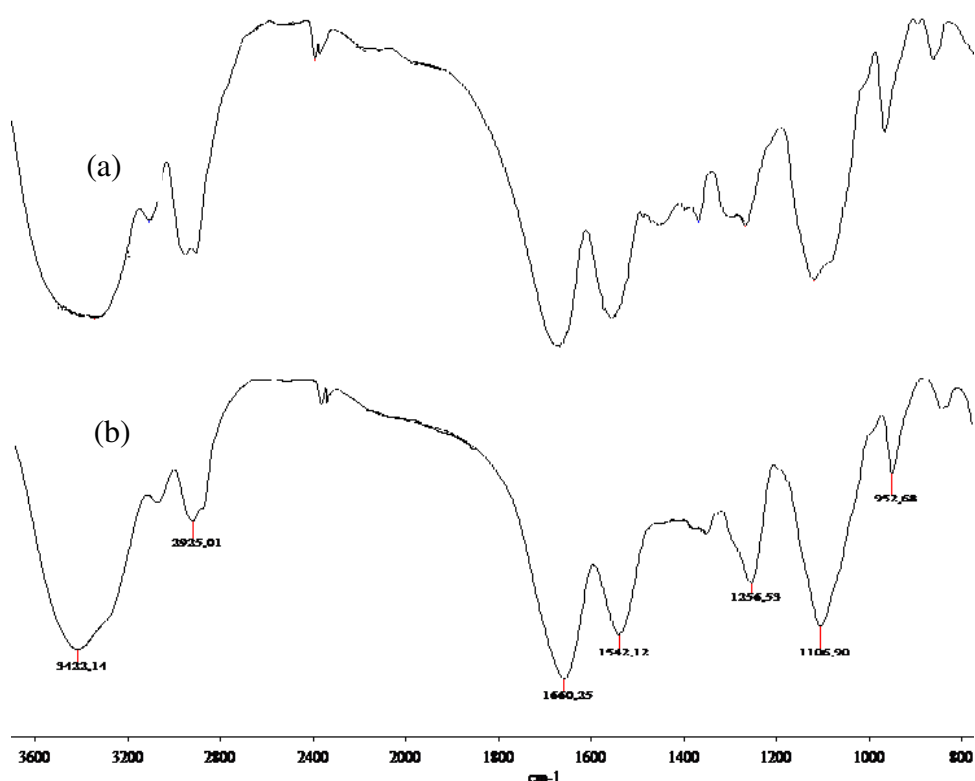
Il grado di funzionalizzazione in EDA è stato calcolato dallo spettro <sup>1</sup>H-NMR (figura 22), registrato in D<sub>2</sub>O, paragonando l'integrale del picco relativo ai protoni a 2.940 δ attribuiti ai -(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>) appartenenti all'EDA (segnale **a** nello spettro) con l'integrale del picco relativo ai protoni a 2.736 δ attribuibili ai -(CO-CH-CH<sub>2</sub>-CO-NH)- del PHEA (segnale **b** nello spettro), ed è risultato essere pari al 42 ± 2% in moli rispetto alle moli di unità ripetitive di PHEA-PEG<sub>2000</sub>.



**Figura 22.** Spettro <sup>1</sup>H-NMR del PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA

Dall'analisi FT-IR (KBr) (figura 23) invece, non è possibile notare l'avvenuto legame dell'EDA al copolimero PHEA-PEG<sub>2000</sub> poiché la banda II ammidica (nella regione 1650-1515 cm<sup>-1</sup>, dovuta al *bending*

dell'NH) e le bande amminiche (vibrazioni di *stretching*: nella regione 3500-3400  $\text{cm}^{-1}$ ; vibrazioni di *bending*: nella regione 1650-1580  $\text{cm}^{-1}$ ) relative all'EDA si sovrappongono alle bande di *stretching* del legame C=O (intorno a 1650  $\text{cm}^{-1}$ ), alle altre bande II ammidiche e alle bande relative allo *stretching* dell'-OH (nella regione 3600-3200  $\text{cm}^{-1}$ ) caratteristiche del copolimero di partenza PHEA-PEG<sub>2000</sub>.



**Figura 23.** Confronto degli spettri FT-IR del PHEA-PEG<sub>2000</sub> (a) e del PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA (b)

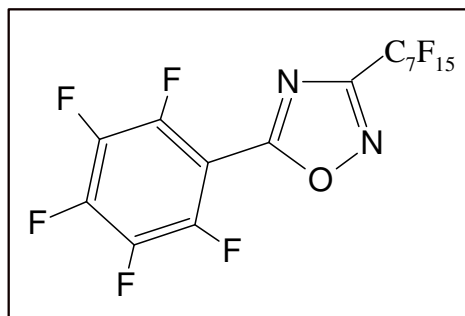
Infine, l'analisi SEC in DMF ha evidenziato per il derivato PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA un valore di peso molecolare pari a 57.0 kDa, con un indice di polidispersità pari a 1.9. La leggera diminuzione del peso molecolare del PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA rispetto al PHEA-PEG<sub>2000</sub>, potrebbe essere dovuta ad una parziale degradazione del polimero in seguito alla reazione con il PNFC.

### 3.1.3 Sintesi e caratterizzazione dei copolimeri PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX e PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX

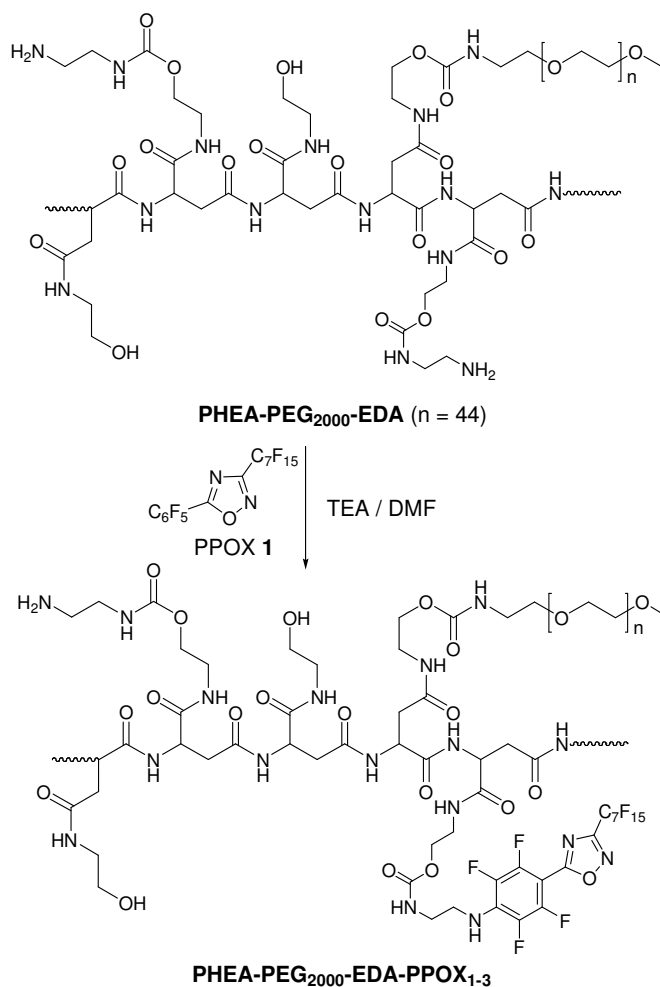
Al fine di ottenere composti anfifilici fluorurati derivati dal PHEA, è stata messa a punto la sintesi di due copolimeri, il PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX e il PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX, da cui sono stati ottenuti aggregati micellari polimerici potenzialmente utilizzabili come sistemi per la veicolazione di farmaci lipofili.

#### 3.1.3.1 Copolimero PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX

Il PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA ( $DD_{\text{PEG}_{2000}-\text{NH}_2} = 4.0 \pm 0.5\%$  in moli e  $DD_{\text{NH}_2} = 42 \pm 2\%$  in moli) è stato fatto reagire in DMF anidra con il 5-pentafluorofenil-3-perfluoroetil-1,2,4-ossadiazolo (PPOX) (figura 24), il quale è in grado di subire una reazione di sostituzione nucleofila aromatica ( $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ ) da parte dei gruppi amminici dell'EDA legata al *backbone* polimerico del PHEA (schema 3).



**Figura 24.** 5-pentafluorofenil-3-perfluoroetil-1,2,4-ossadiazolo (PPOX)



**Schema 3.** Schema di sintesi del copolimero PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>1-3</sub>

La sintesi dei copolimeri PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>1-3</sub> con diverso grado di funzionalizzazione è stata condotta in DMF anidra a 25°C per 24 ore, utilizzando quantità di 5-pentafluorofenil-3-perfluoroetil-1,2,4-ossadiazolo (PPOX) e di trietilammina (TEA), usata come catalizzatore, calcolate in accordo con i valori di X'' e Y'' riportati in tabella 2.

**Tabella 2.** Valori di X'' e Y'' impiegati nella sintesi del PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX

|   | X'' | Y'' |
|---|-----|-----|
| PHEA-PEG <sub>2000</sub> -EDA-PPOX <sub>1</sub> | 0.6 | 0.6 |
| PHEA-PEG <sub>2000</sub> -EDA-PPOX <sub>2</sub> | 1.2 | 0.6 |
| PHEA-PEG <sub>2000</sub> -EDA-PPOX <sub>3</sub> | 2   | 1   |

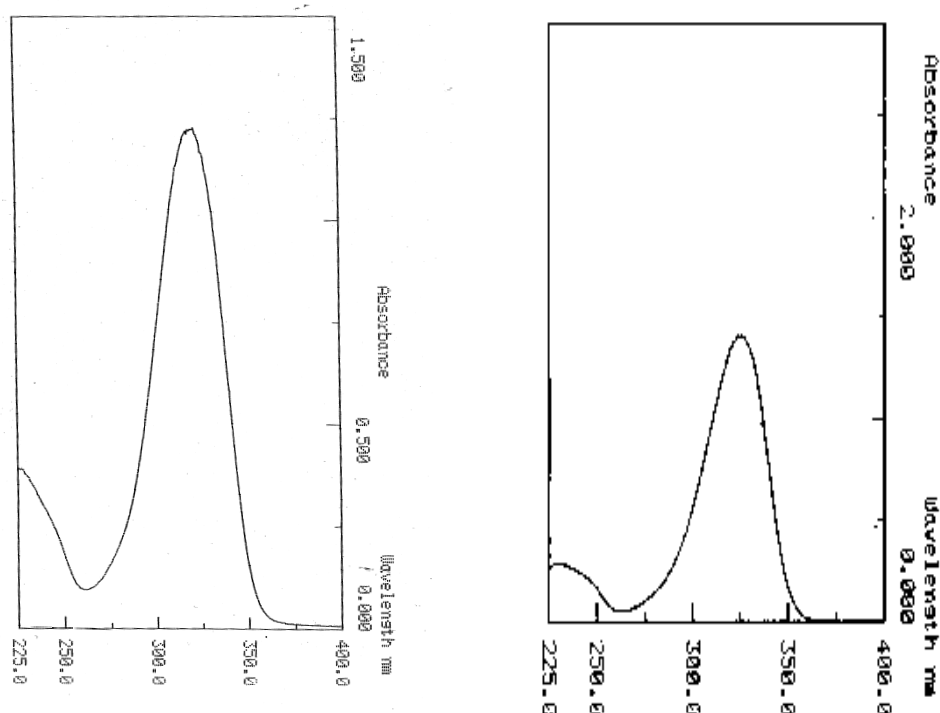
$$X'' = \frac{\text{moli PPOX}}{\text{moli -NH}_2 \text{ del PHEA-PEG}_{2000}\text{-EDA}}$$

$$Y'' = \frac{\text{moli TEA}}{\text{moli -NH}_2 \text{ del PHEA-PEG}_{2000}\text{-EDA}}$$

I copolimeri PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX preparati con X'' pari a 0.6; 1.2 e 2, e indicati rispettivamente come PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>1</sub>, PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>2</sub> e PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>3</sub>, sono stati ottenuti con una resa pari al 65%, 82% e 98% p/p rispetto al PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA di partenza.

Il grado di derivatizzazione percentuale in PPOX (DD%) è stato calcolato mediante analisi UV, adottando una procedura già riportata per altri coniugati del PHEA [Pitarresi G. *et al.*, 2008 (C); Mandracchia D. *et al.*, 2007; Cavallaro G. *et al.*, 2004 (A)].

Lo spettro di assorbimento UV-vis è stato registrato in etanolo nel range di lunghezza d'onda 225-400 nm e mostra un massimo di assorbimento a 325 nm (figura 25) mentre il PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA non mostra assorbimento nello stesso *range*.



**Figura 25.** A sinistra, spettro UV del copolimero PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX. A destra, spettro UV del composto di riferimento PPOX'

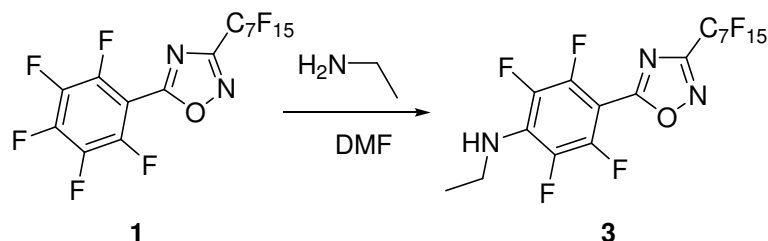
Tale spettro risulta differente da quello dell'ossadiazolo di partenza (PPOX) utilizzato per la funzionalizzazione, che mostra un massimo a 245 nm. Questa caratteristica è imputabile alla sostituzione del fluoro nella posizione 4' con il gruppo amminico dell'EDA, che causa un *red-shift* del massimo di assorbimento [Buscemi S. et al., 2006 (B)].

A causa di tale *red-shift* del massimo di assorbimento del copolimero fluorurato, per determinare la curva di calibrazione non può essere direttamente utilizzato l'ossadiazolo di partenza PPOX, pertanto è stato sintetizzato un ossadiazolo di riferimento indicato come PPOX' (spettro UV in figura 25).

In particolare, il 2,3,5,6-tetrafluoro-4-etilammino-fenil)-3-perfluoroetil-1,2,4-ossadiazolo (PPOX') (3) di riferimento è stato



ottenuto tramite  $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$  sul PPOX (1) con etilammina in DMF a temperatura ambiente (schema 4).



**Schema 4.** Schema di sintesi dell'ossadiazolo di riferimento PPOX' (3)

Tramite determinazione dell' $\epsilon_{\text{max}}$  del composto di riferimento, è stato determinato il corrispondente  $E_{1\%}$  per PPOX', che risulta pari a 536.6 a 325 nm. Tramite analisi UV, comparando l' $E_{1\%}$  di ogni copolimero PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>1-3</sub> con l' $E_{1\%}$  del corrispondente ossadiazolo di riferimento, è stato determinato il DD in ossadiazolo legato per ogni copolimero preparato (tabella 3).

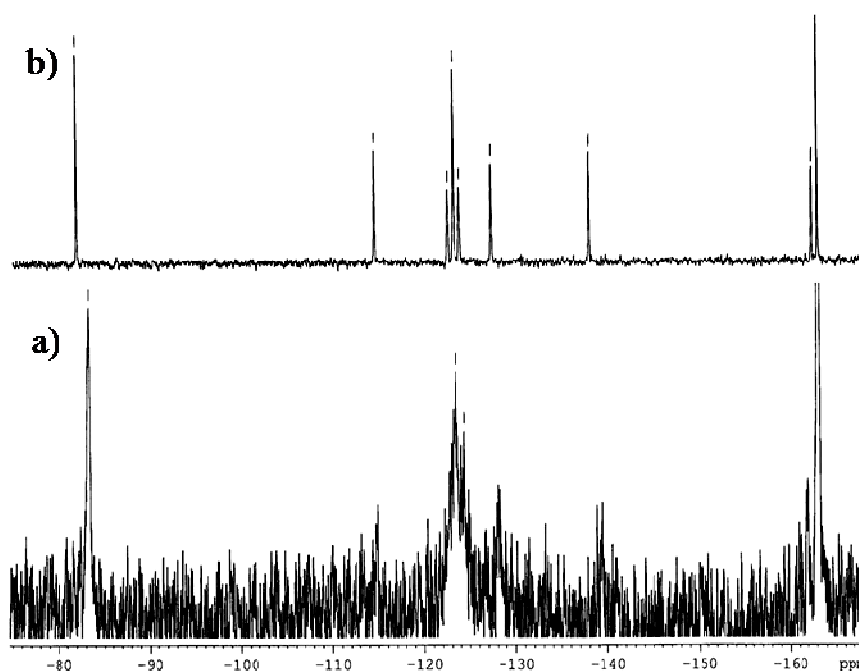
**Tabella 3.** Parametri di reazione, resa e  $\text{DD}_{\text{PPOX}}$  in moli%

|   | X'' | Y'' | RESA %<br>(p/p) | DD moli%<br>(in PPOX) |
|---|-----|-----|-----------------|-----------------------|
| PHEA-PEG <sub>2000</sub> -EDA-PPOX <sub>1</sub> | 0.6 | 0.6 | 65              | 18                    |
| PHEA-PEG <sub>2000</sub> -EDA-PPOX <sub>2</sub> | 1.2 | 0.6 | 82              | 27                    |
| PHEA-PEG <sub>2000</sub> -EDA-PPOX <sub>3</sub> | 2   | 1   | 98              | 30                    |

Dalla tabella 3 è possibile notare come i valori di resa (espressi come % peso/peso) e di grado di derivatizzazione (DD, espresso come % in moli) in PPOX aumentano all'aumentare dei valori di X'' e Y'', fino a raggiungere un valore massimo per valori di X'' e Y'' pari rispettivamente a 2 e 1. Il copolimero PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>3</sub> a

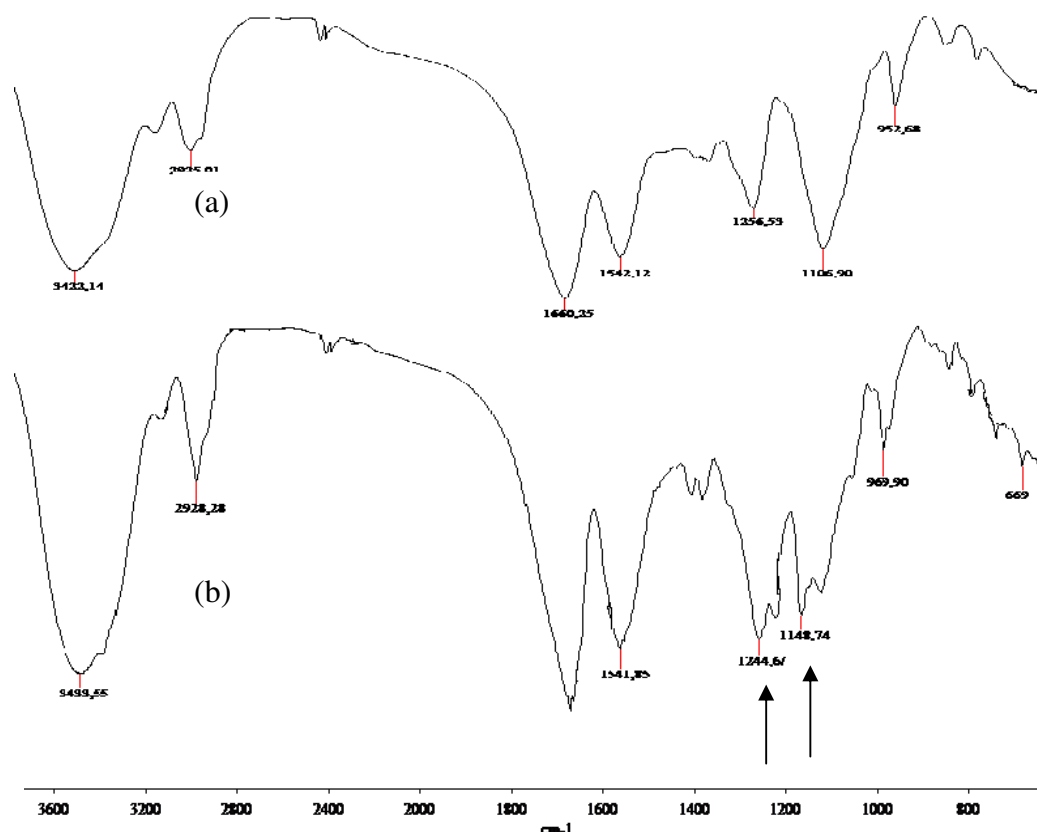
più alto contenuto in ossadiazolo fluorurato ( $DD_{PPOX} = 30\%$  in moli) è stato caratterizzato mediante analisi  $^{19}\text{F}$ -NMR e FT-IR.

L'analisi  $^{19}\text{F}$ -NMR (figura 26) in  $\text{DMSO-}d_6$  del coniugato PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>3</sub> (b), nonostante la scarsa risoluzione, mostra la presenza di un residuo ossadiazolico para-sostituito, dato ulteriormente supportato dal confronto dello spettro in  $\text{DMSO-}d_6$  del composto di riferimento PPOX' (a). La scarsa risoluzione dei gruppi di picchi può essere imputata all'aumentato tempo di rilassamento dei nuclei di fluoro in conseguenza della formazione di aggregati di copolimero.



**Figura 26.** Spettro  $^{19}\text{F}$ -NMR del composto di riferimento PPOX' (a) e del PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>3</sub> (b)

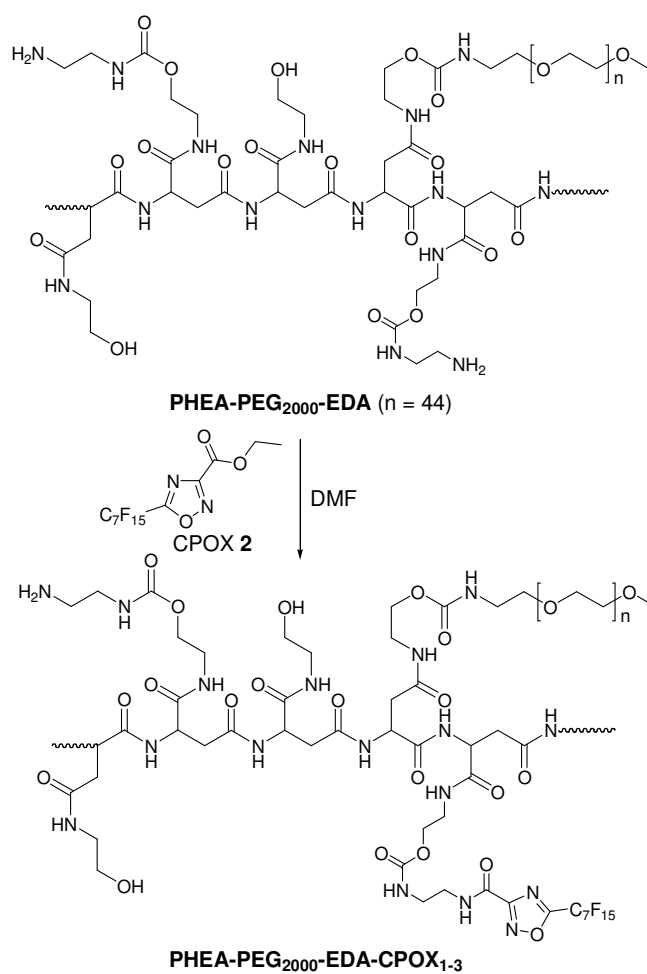
L'analisi FT-IR (figura 27) mostra la comparsa, rispetto allo spettro del PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA di partenza, di bande a 1120-1350  $\text{cm}^{-1}$ , imputabili allo *stretching* dei  $\text{CF}_2$  e dei F aromatici.



**Figura 27.** Spettro FT-IR del PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA (a) e del PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX (b)

### 3.1.3.2 Copolimero PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX

Il copolimero PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA è stato fatto reagire in DMF anidra con il 3-carbossietil-5-perfluoroetil-1,2,4-ossadiazolo (CPOX) il quale è capace di subire facilmente una reazione di sostituzione nucleofila acilica da parte dei gruppi amminici [Palumbo Piccionello A. *et al.*, 2009] della catena laterale del PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA (schema 5). In questo caso non si è rivelata necessaria la catalisi basica da TEA.



**Schema 5.** Schema di sintesi del copolimero PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX

La reazione è stata condotta a 25 °C per 24 ore. Le quantità di CPOX impiegate sono state calcolate in accordo con tre diversi valori di X''' pari a 0.6; 1.2; 2, dove X''' rappresenta il rapporto tra le moli di CPOX e le moli di gruppi amminici dell'EDA.

Come mostrato in tabella 4, i copolimeri PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX preparati con X''' pari a 0.6; 1.2 e 2, e indicati in questo lavoro di tesi rispettivamente come PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>1</sub>, PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>2</sub> e PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>3</sub>, sono

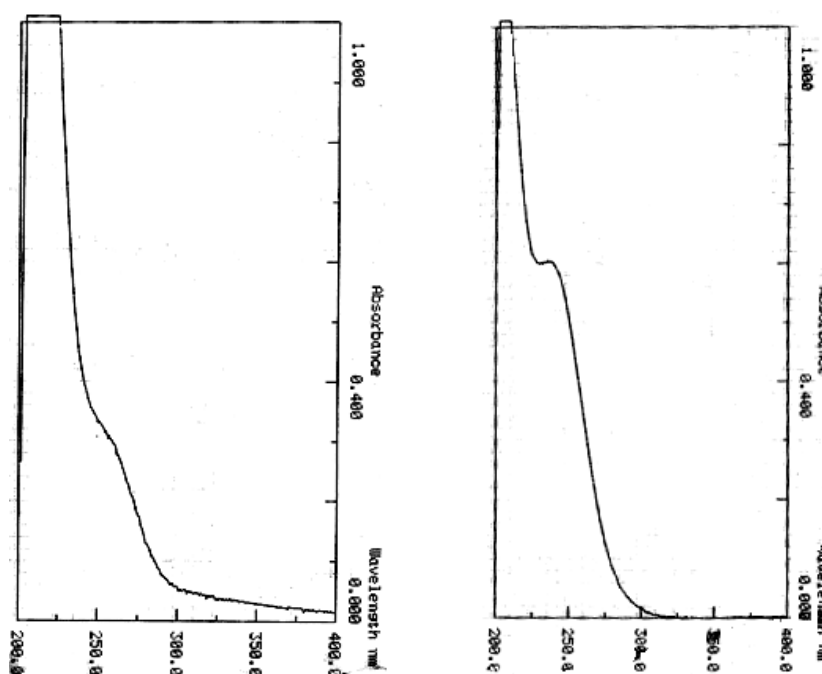
stati ottenuti rispettivamente con una resa pari al 90%, 85% e 92% p/p rispetto al PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA di partenza.

Anche in questo caso, il grado di derivatizzazione in CPOX (tabella 4) è stato calcolato mediante analisi UV condotta in etanolo.

**Tabella 4.** Parametri di reazione, resa e DD<sub>CPOX</sub> in moli %

|   | X'' | RESA %<br>(p/p) | DD moli% (in<br>CPOX) |
|---|-----|-----------------|-----------------------|
| PHEA-PEG <sub>2000</sub> -EDA-CPOX <sub>1</sub> | 0.6 | 90              | 15                    |
| PHEA-PEG <sub>2000</sub> -EDA-CPOX <sub>2</sub> | 1.2 | 85              | 22                    |
| PHEA-PEG <sub>2000</sub> -EDA-CPOX <sub>3</sub> | 2   | 92              | 22                    |

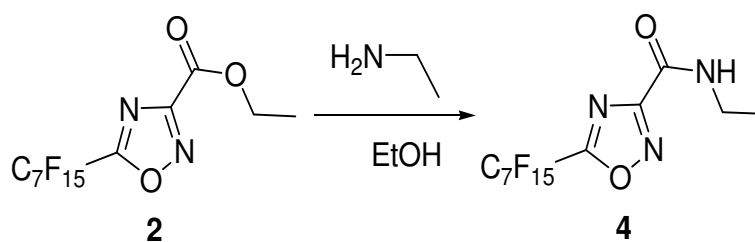
Lo spettro UV del PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX (figura 28) mostra una spalla a 250 nm, mentre l'ossadiazolo di partenza (CPOX) non mostra alcun assorbimento.



**Figura 28.** A sinistra, spettro UV del copolimero PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX. A destra, spettro UV del composto di riferimento CPOX'

La differenza tra lo spettro ottenuto per il copolimero e quello del corrispondente ossadiazolo di partenza utilizzato per la funzionalizzazione, è imputabile alla formazione del legame ammidico nell'ossadiazolil-estere (CPOX). Pertanto, l'ossadiazolo di partenza (CPOX) non può essere impiegato per la costruzione della curva di calibrazione e, dunque, è stato sintetizzato l'ossadiazolo di riferimento indicato come CPOX' (spettro UV in figura 28).

Il composto di riferimento 5-perfluoroetil-3-N-etilcarbossiammido-1,2,4-ossadiazolo (CPOX') è stato ottenuto tramite sostituzione nucleofila acilica con etilammina in etanolo a temperatura ambiente, a partire dal composto CPOX (schema 6).

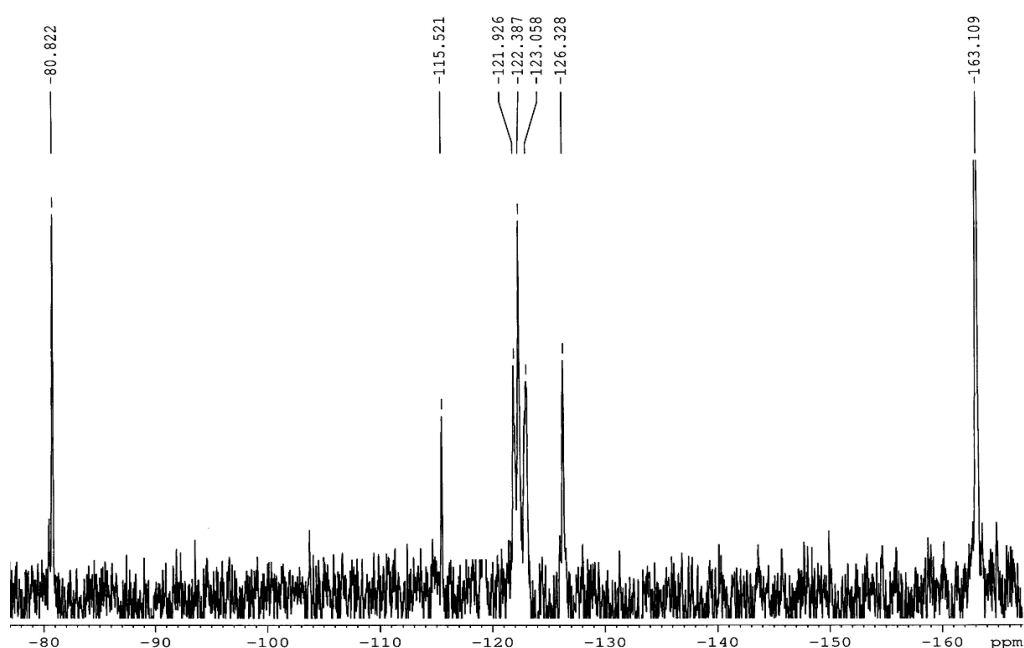


**Schema 6.** Schema di sintesi dell'ossadiazolo modello CPOX'

Tramite determinazione dell' $\epsilon_{\text{max}}$  del composto di riferimento, è stato determinato il corrispondente  $E_{1\%}$  per CPOX', che risulta pari a 53.5 a 250 nm. Comparando l' $E_{1\%}$  di ogni copolimero PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>1-3</sub> con quello dei corrispondenti ossadiazoli di riferimento, è stato determinato il DD in CPOX legato, per ogni copolimero preparato. È stato trovato che si ha un incremento del valore di DD al variare del valore di X''' da 0.6 a 1.2, sebbene tale valore rimanga costante, e pari al 22% in moli, anche per valori di X''' maggiori di 1.2.

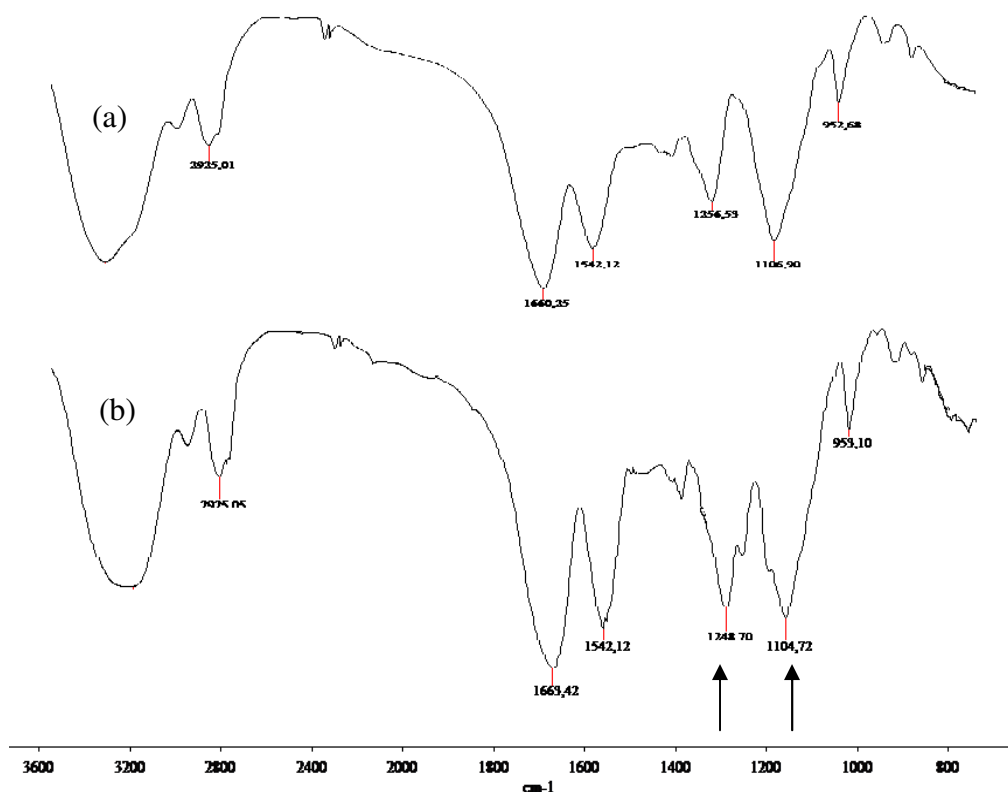
Il copolimero PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>3</sub> a più alto contenuto in ossadiazolo fluorurato (DD<sub>CPOX</sub> = 22 % in moli) è stato caratterizzato mediante analisi <sup>19</sup>F-NMR e FT-IR.

Lo spettro <sup>19</sup>F-NMR in DMSO-*d*<sub>6</sub> del coniugato PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>3</sub> (figura 29) mostra la presenza della catena perfluoroetilica, confermando l'introduzione della porzione ossadiazolica covalentemente legata al *backbone* polimerico.



**Figura 29.** Spettro <sup>19</sup>F-NMR del PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>3</sub>

Dall'analisi FT-IR (figura 30) si può notare la comparsa, rispetto allo spettro del PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA di partenza, di bande a 1120-1350 cm<sup>-1</sup>, imputabili allo *stretching* dei CF<sub>2</sub> e dei F aromatici.



**Figura 30.** Confronto degli spettri FT-IR del PHEA-PEG-EDA (a) e del PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX (b)

### 3.1.4 Analisi SEC

Mediante analisi cromatografica ad esclusione dimensionale (SEC), Sono stati determinati i valori di peso molecolare dei copolimeri PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>3</sub> e PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>3</sub>, utilizzando come fase mobile una soluzione di DMF + 0,01M LiCl oppure una soluzione acquosa di tampone TRIS a pH 8. In entrambi i casi è stata utilizzata una concentrazione di copolimeri pari a 3 mg/ml. I risultati dell'analisi SEC sono riportati nella tabella 5.

I valori di peso molecolare ottenuti in DMF sono in accordo con il grado di derivatizzazione in PPOX e in CPOX del copolimero PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA.



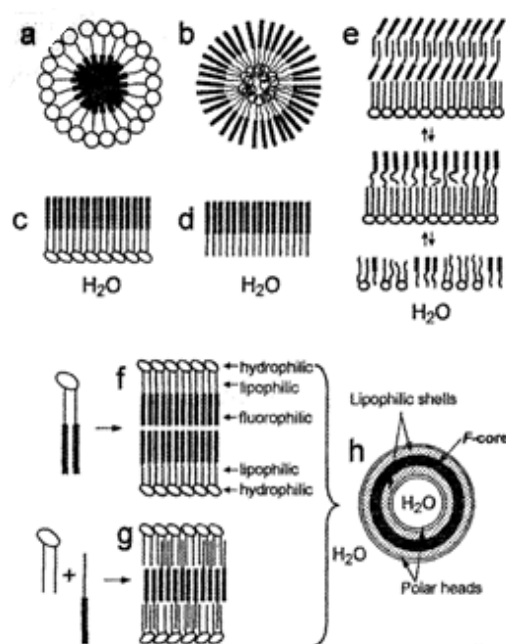
L'analisi SEC condotta in fase acquosa ha consentito di valutare le potenziali capacità di *self-assembly* dei copolimeri PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>3</sub> e PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>3</sub>. Da tale analisi appare evidente che il copolimero PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>3</sub> è in grado di generare in fase acquosa degli aggregati, come mostrato dall'elevato valore di peso molecolare, pari a 1.224,3 kDa. Invece per il copolimero PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>3</sub> non è stato possibile, nelle condizioni sperimentali adottate, risalire al valore del peso molecolare dell'aggregato in fase acquosa.

**Tabella 5.** Pesì molecolari ed indici di polidispersità determinati tramite analisi SEC

| <b>Mezzo: DMF + LiCl 0,01 M</b>                 |                   |                                 |
|---|-------------------|---------------------------------|
| <b>Campione</b>                                 | <b>Mw (kDa)</b>   | <b>Indice di polidispersità</b> |
| PHEA  | 40.5              | 1.85                            |
| PHEA-PEG <sub>2000</sub>                        | 62.3              | 1.83                            |
| PHEA-PEG <sub>2000</sub> -EDA                   | 57.0              | 1.90                            |
| PHEA-PEG <sub>2000</sub> -EDA-PPOX <sub>3</sub> | 89.1              | 1.75                            |
| PHEA-PEG <sub>2000</sub> -EDA-CPOX <sub>3</sub> | 82.9              | 1.90                            |
| <b>Mezzo: Tampone Tris pH 8.0</b>               |                   |                                 |
| PHEA  | 44.4              | 1.83                            |
| PHEA-PEG <sub>2000</sub>                        | 67.0              | 1.85                            |
| PHEA-PEG <sub>2000</sub> -EDA                   | Non solubile      | -                               |
| PHEA-PEG <sub>2000</sub> -EDA-PPOX <sub>3</sub> | 1224.3            | 1.80                            |
| PHEA-PEG <sub>2000</sub> -EDA-CPOX <sub>3</sub> | Non determinabile | -                               |

Tuttavia non è da escludere che probabilmente alle concentrazioni utilizzate di 3 mg/ml si formano aggregati che lo strumento non è in

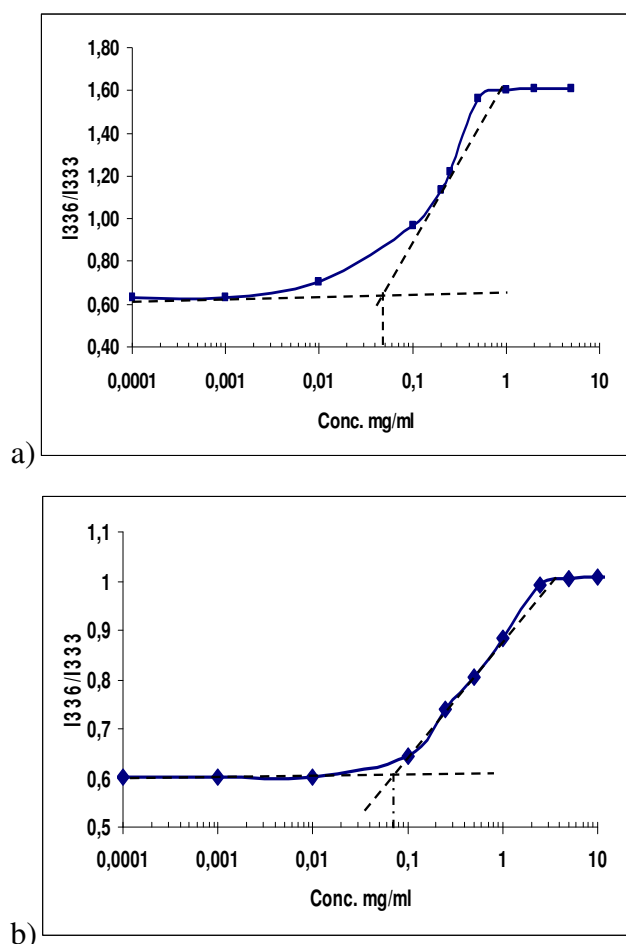
grado di rilevare. Infatti è noto che i polimeri anfifilici fluorurati tendono ad auto-aggregarsi in vari mezzi, generando diversi tipi di sistemi (quali micelle, film di Langmuir, membrane a doppio strato, vescicole) di dimensioni nanometriche (figura 31), che potrebbero non essere rilevati dall'analisi SEC [Matsuoka K. and Moroi Y., 2003].



**Figura 31.** Esempi di sistemi di dimensioni nanometriche costituiti da copolimeri anfifilici fluorurati: (a) micella; (b) micella inversa; (c) film di Langmuir interamente costituito da tensioattivi fluorurati; (d) film di Langmuir costituito da diblock parzialmente fluorurati; (e) segregazione verticale reversibile all'interno di un film di Langmuir costituito da fosfolipidi e diblock parzialmente fluorurati [Krafft M. P. et al., 2001]; (f) membrana a doppio strato formata da anfifilici aventi doppie estremità fluorurate; (g) membrana a doppio strato costituita da una miscela di fosfolipidi e di diblock parzialmente fluorurati; (h) rappresentazione schematica del core fluorurato che caratterizza le vescicole e gli aggregati cilindrici fluorurati: il core fluorurato, idrofobico e lipofobico, è circondato da due strati lipofilici, i quali a loro volta sono avvolti da due strati idrofilici costituiti dalle teste polari [Riess J.G., 1994].

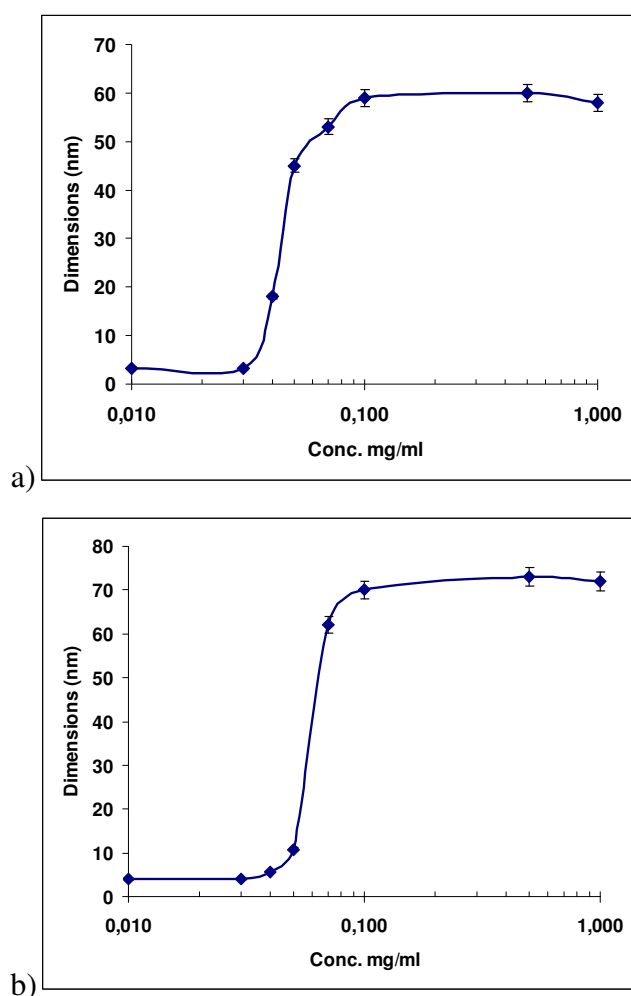
### 3.1.5 Determinazione della concentrazione di aggregazione critica

Considerate le potenzialità di *self-assembling* dei copolimeri fluorurati oggetto di studio, è stata determinata la concentrazione di aggregazione critica (CAC) utilizzando il pirene come sonda fluorescente (vedi parte sperimentale) ed i risultati ottenuti, riportati in figura 32, hanno consentito di determinare un valore di CAC che corrisponde a circa 0.05 mg/ml per il copolimero PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>3</sub> e a circa 0.07 mg/ml per il copolimero PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>3</sub>.



**Figura 32.** Grafici del rapporto tra le intensità  $I_{336}/I_{333}$  dello spettro di eccitazione del pirene in funzione della concentrazione (mg/ml) dei copolimeri PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>3</sub> (a) e PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>3</sub> (b)

Analogamente a quanto effettuato da altri autori [Khanh C. H. and Mecozzi S., 2004], al fine di confermare i valori di CAC determinati con il saggio con il pirene sono state effettuate misure di *light scattering* sui copolimeri PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>3</sub> e PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>3</sub>, per valutare la comparsa di aggregati in funzione della concentrazione polimerica. I risultati ottenuti sono riportati nella figura 33.



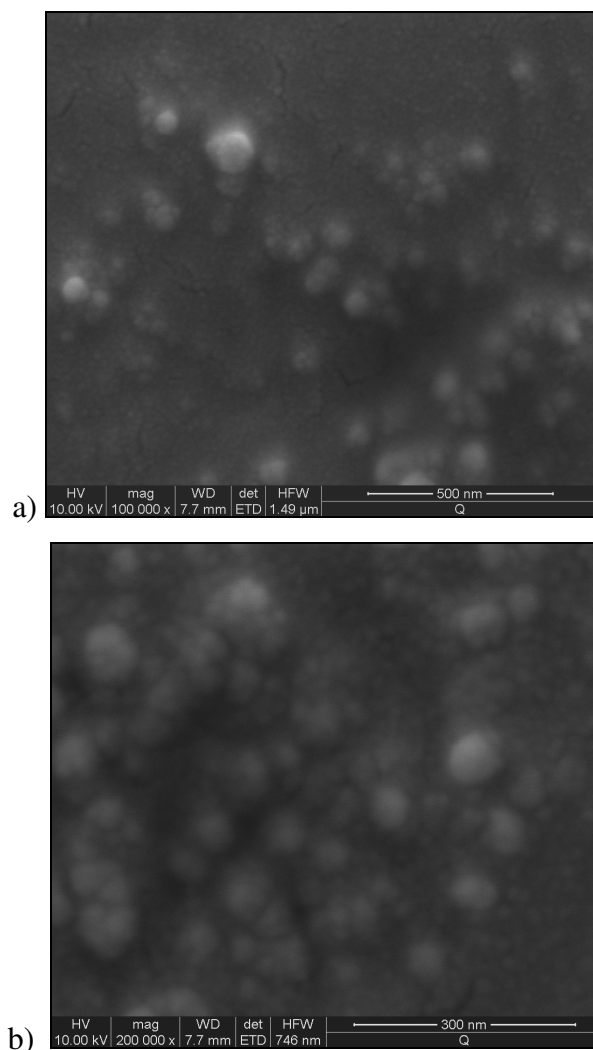
**Figura 33.** Grafici delle dimensioni degli aggregati dei copolimeri PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>3</sub> (a) e PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>3</sub> (b) in funzione delle rispettive concentrazioni

In tal modo, è stato possibile rilevare un valore di CAC di circa 0.05 mg/ml per il copolimero PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>3</sub>, mostrando la presenza a tali concentrazioni di aggregati con diametro medio pari a circa 40-50 nm. Invece per il copolimero PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>3</sub> la CAC risulta essere intorno a 0.07 mg/ml, con aggregati il cui diametro medio è pari a circa 50-60 nm.

### **3.1.6 Analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM)**

Allo scopo di valutare la morfologia e le dimensioni degli aggregati polimerici formati in fase acquosa, è stata condotta un'analisi SEM sugli aggregati ottenuti dai copolimeri PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>3</sub> e PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>3</sub>.

La figura 34 mostra le immagini ottenute per entrambi i campioni analizzati.



**Figura 34.** Immagini SEM degli aggregati PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>3</sub> (a) e PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>3</sub> (b)

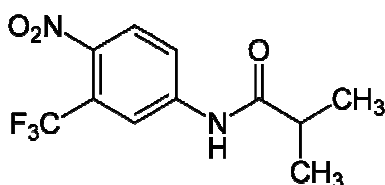
Da tali immagini si osserva la presenza di aggregati di forma sferica con dimensioni medie intorno a 50-70 nm, in accordo con i valori ottenuti dalle misure di *light scattering*.

### 3.1.7 Valutazione della capacità degli aggregati polimerici di solubilizzare farmaci lipofili

Per valutare la capacità dei copolimeri PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>3</sub> e PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>3</sub> a più alto contenuto in ossadiazolo fluorurato di incrementare la solubilità in acqua di farmaci fluorurati poco solubili, sono stati effettuati studi di solubilizzazione utilizzando la flutamide, un farmaco di sintesi impiegato nel trattamento del carcinoma della prostata [Manfred P. Wirth *et al.*, 2007]. Si ipotizza che le porzioni fluorurate presenti all'interno dei copolimeri oggetto di studio possano esercitare un'interazione favorevole con gli atomi di fluoro del farmaco, consentendo un incremento di solubilità del farmaco stesso.

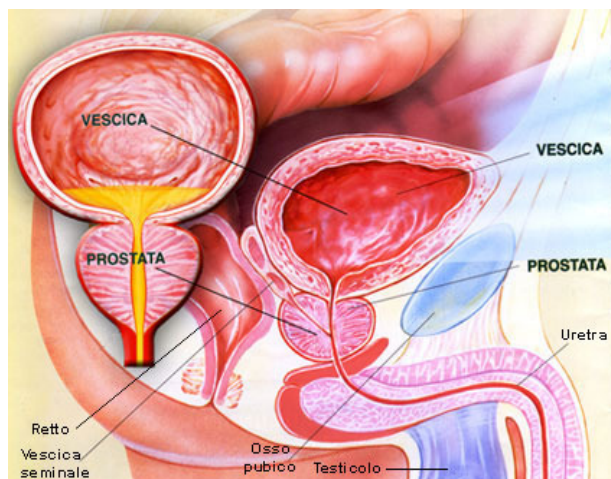
#### 3.1.7.1 La flutamide e il carcinoma prostatico

La flutamide (figura 35) è un farmaco di sintesi a struttura non steroidea con effetti antiandrogeni [Manfred P. Wirth *et al.*, 2007].



**Figura 35.** Formula di struttura della flutamide

La prostata (figura 36) è una ghiandola dell'apparato riproduttivo maschile posta al di sotto della vescica che produce e secerne un liquido che stimola la motilità degli spermatozoi e contribuisce per circa il 20-30 % al volume totale del liquido seminale.



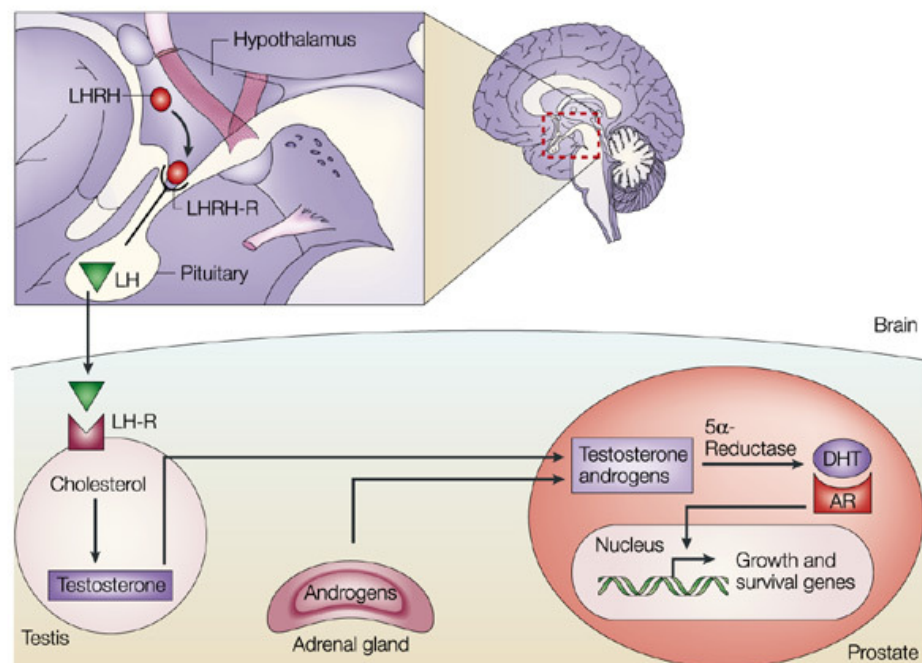
**Figura 36.** Visione anteriore e laterale della prostata

A volte, a livello delle cellule ghiandolari secretorie, può originarsi un focolaio di cellule neoplastiche che, proliferando, determinano l'insorgenza del carcinoma prostatico. Il carcinoma della prostata è la seconda neoplasia maligna più frequente nell'uomo e, a seconda dello stadio di progressione tumorale, può essere trattato mediante radiazione localizzata o attraverso intervento chirurgico alla prostata stessa (prostatectomia), sebbene entrambe queste procedure spesso provochino una riduzione della funzionalità sessuale e incontinenza urinaria [Martini F.H. et al., 2003]. Nei casi in cui non è possibile eseguire la terapia chirurgica o radioterapica, o quando il tumore ha già formato metastasi, si esegue un trattamento ormonale antiandrogenico impiegando farmaci che inibiscono l'azione di stimolo da parte degli androgeni endogeni sulle cellule tumorali prostatiche, ritardando in questo modo la progressione tumorale: la progressione del carcinoma prostatico, infatti, è stimolata dal testosterone (ormone androgeno) e dal suo derivato più attivo, il diidrotestosterone (DHT), prodotto dall'enzima  $5\alpha$ -reduttasi a partire dal testosterone stesso. I farmaci antiandrogeni, come ad esempio la



flutamide, si comportano da antagonisti competitivi degli androgeni a livello della cellula bersaglio, inibendo il legame dell'ormone endogeno al recettore ed impedendo quindi la traslocazione del complesso ormone-recettore nel nucleo della cellula e l'attivazione dei geni implicati nella crescita e nella proliferazione cellulare.

In realtà nel carcinoma della prostata è implicato un meccanismo ormonale più complesso (figura 37): la produzione dell'ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRH o LHRH) da parte dell'ipotalamo determina il rilascio, da parte dell'ipofisi anteriore, dell'ormone luteinizzante (LH) che a sua volta stimola le cellule di Leydig a produrre testosterone. Quest'ultimo verrà poi metabolizzato dall'enzima  $5\alpha$ -reduttasi nella forma più attiva (DHT) che si andrà a legare ai recettori per gli androgeni (AR) e, dopo traslocazione del complesso enzima-recettore nel nucleo, si avrà l'espressione di geni implicati nella proliferazione cellulare [Ganong W.F., 2008].



**Figura 37.** Ormoni coinvolti nel tumore alla prostata

Nel trattamento del carcinoma prostatico metastatizzato, la flutamide, che dopo assorbimento viene metabolizzata in una forma più attiva (idrossiflutamide), deve essere assunta per via orale 3 volte al giorno (750 mg/giorno) per circa 6 settimane.

### **3.1.8 Studi di solubilizzazione della flutamide**

Mediante analisi HPLC è stata valutata la capacità dei copolimeri PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>3</sub> e PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>3</sub> a più alto contenuto in ossadiazolo fluorurato di incrementare la solubilità della flutamide in fase acquosa. In particolare, sono stati condotti in acqua studi di solubilizzazione della flutamide da sola e in presenza dei copolimeri PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>3</sub> e PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>3</sub>. Per valutare il contenuto di flutamide presente all'interno degli aggregati polimerici è stata utilizzata una curva di taratura del farmaco determinata in acqua bidistillata ( $y = 33,351 x - 8,7348$ ).

Dalle analisi HPLC risulta che la massima solubilità della flutamide in acqua a 25°C, è pari a 9.41 mg/l.

Per determinare l'aumento di solubilità in acqua della flutamide in presenza degli aggregati polimerici PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>3</sub> e PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>3</sub>, il farmaco è stato opportunamente miscelato ai suddetti polimeri (vedi parte sperimentale) e mediante HPLC si è determinato un incremento di solubilità di circa 27 volte in presenza degli aggregati del copolimero PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>3</sub>, e di circa 30 volte in presenza degli aggregati del copolimero PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>3</sub>. Tale aumento di solubilità, dovuto all'introduzione del farmaco all'interno della porzione idrofobica degli aggregati polimerici, potrebbe essere favorito dalle interazioni che si

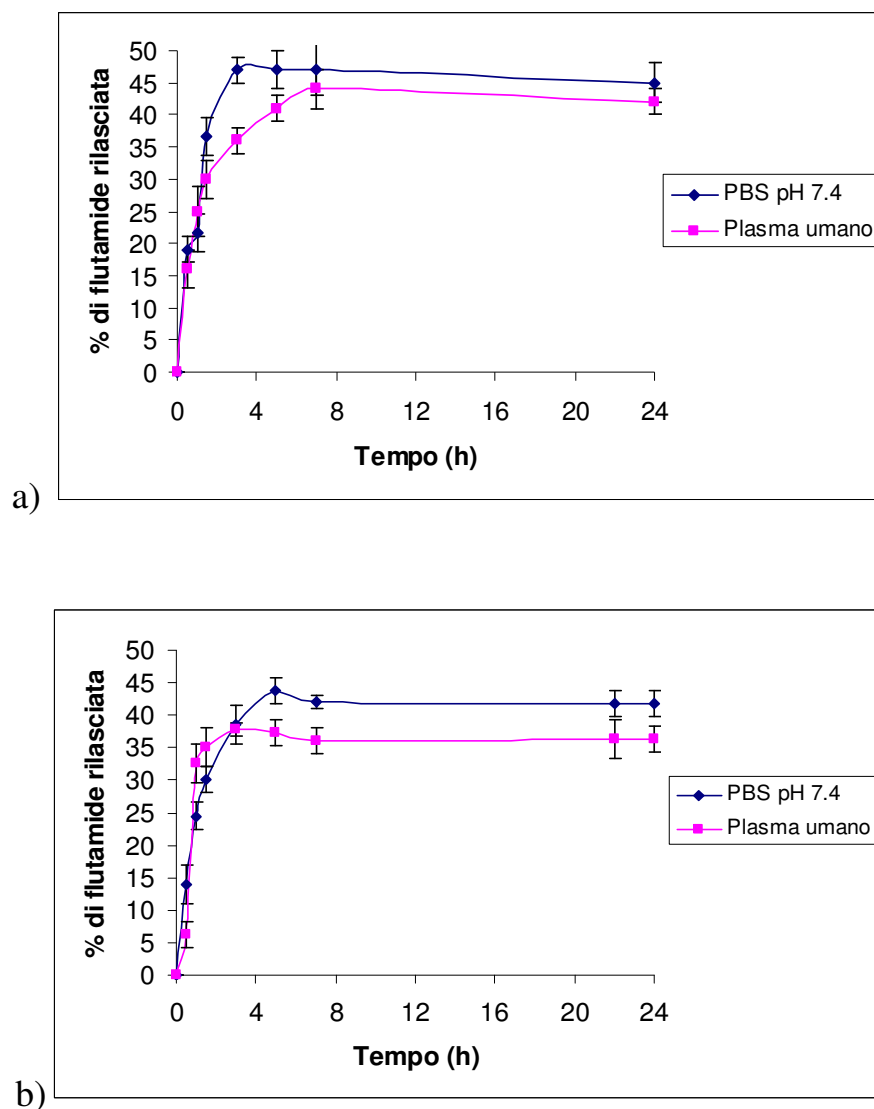
sviluppano tra le porzioni fluorurate presenti nei due copolimeri e gli atomi di fluoro della flutamide stessa.

La tecnica usata per il caricamento del farmaco in entrambi tipi di micelle ha fornito buoni risultati in termini di percentuale di farmaco caricato: le micelle derivanti dal polimero PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>3</sub> possiedono una percentuale in peso di farmaco caricato (*Drug Loading %*) rispetto a 100 mg di materiale secco pari a 4.52 % (p/p), e le micelle derivanti dal polimero PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>3</sub> possiedono una percentuale in peso di farmaco caricato (*Drug Loading %*) rispetto a 100 mg di materiale secco pari a 3.51 % (p/p).

La leggera differenza nella quantità di flutamide caricata nei due tipi di micelle potrebbe essere spiegata in base al diverso grado di derivatizzazione in ossadiazolo fluorurato nei due copolimeri PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>3</sub> e PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>3</sub>.

### **3.1.9 Studi di stabilità delle micelle**

Per valutare la stabilità delle micelle polimeriche di PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>3</sub> e PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>3</sub> sono stati condotti studi in soluzione isotonica di tampone fosfato (PBS) pH 7.4, mimante i fluidi extracellulari ed in plasma umano pretrattato. In entrambi i casi è stato adottato il metodo della dialisi. Questi studi sono stati condotti valutando la quantità percentuale di flutamide rilasciata rispetto alla quantità totale di essa presente nelle micelle, in funzione del tempo. La figura 38 mostra i profili di rilascio del farmaco dalle micelle in PBS pH 7.4 e in plasma umano.



**Figura 38.** Percentuale di flutamide rilasciata dalle micelle di PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>3</sub> (a) e di PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>3</sub> (b) in tampone fosfato pH 7.4 (PBS) e in plasma umano a  $37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$

Come si può notare, entrambi i sistemi mostrano un simile andamento di rilascio del farmaco in PBS pH 7.4 e in plasma umano. In particolare, la percentuale di farmaco rilasciato in plasma umano è leggermente minore rispetto a quello rilasciato in PBS pH 7.4 probabilmente a causa delle specifiche interazioni del farmaco con le proteine plasmatiche [El-Sherif H. et al.,2010].

In entrambi i sistemi micellari e mezzi di rilascio, solo circa il 40-45% di farmaco caricato è rilasciato nel mezzo esterno mentre il restante 55-60% rimane intrappolato nel *core* micellare probabilmente per effetto delle interazioni fluoro-fluoro che si sviluppano tra il *core* fluorurato ed il farmaco.

### **3.1.10 Studi di proliferazione cellulare *in vitro***

L'effetto antiproliferativo esercitato dai sistemi micellari carichi di flutamide è stato valutato sulle cellule di carcinoma prostatico LNCaP (*lymphnode metastatic lesion of human prostatic adenocarcinoma*).

In letteratura, è stato riportato che quando la flutamide è somministrata ad alte concentrazioni, è in grado di indurre apoptosi sulle cellule LNCaP in seguito alla diminuzione dei livelli di proteine *Survivin* appartenenti alla famiglia delle proteine inibitrici dell'apoptosi (IAP) [Zhangl M. Et al., 2005]. Inoltre, in test di esposizione di ratti adulti alla flutamide, è stato evidenziato, che essa induce, in maniera dose-dipendente, un aumento a lungo termine nell'espressione e nell'attivazione delle caspasi 3 e 6, le due caspasi più importanti coinvolte nel meccanismo di morte cellulare, portando ad apoptosi cronica [Omezzine A. et al., 2003].

Nel nostro esperimento, le cellule LNCaP sono state fatte proliferare in presenza del diidrotestosterone (DHT) ed è stato studiato l'effetto di co-incubazione delle cellule con il DHT e con la flutamide sia libera che presente all'interno dei sistemi micellari di PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>3</sub> e di PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>3</sub>. Come mostrato in figura 39 (a, b), quando il DHT viene posto a contatto con le cellule LNCaP si evidenzia un significativo effetto di proliferazione cellulare, che è ciò che avviene durante l'espressione

dell'iperplasia prostatica. Questa proliferazione viene ridotta quando le cellule vengono trattate con la flutamide.

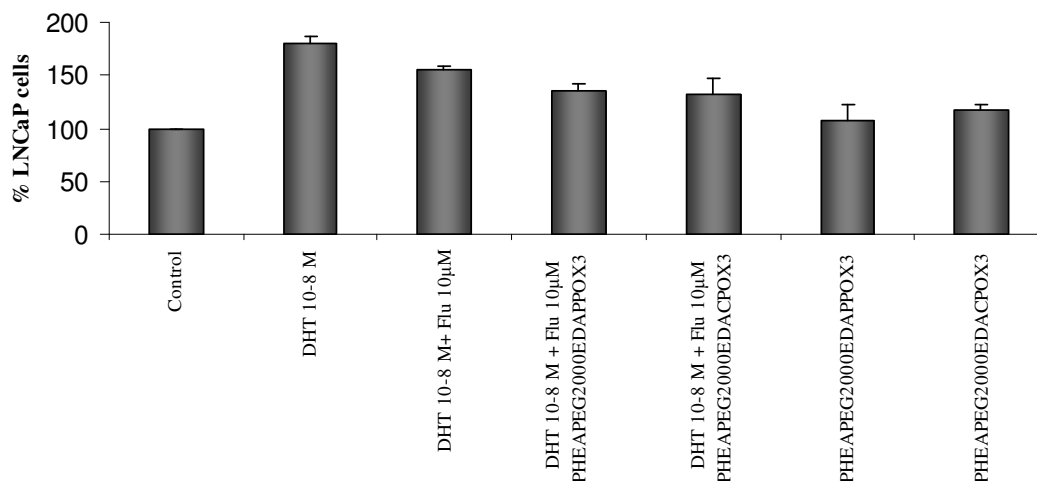
In particolare, in un primo esperimento (figura 39 a) è stato valutato l'effetto antiproliferativo esercitato sulle cellule LNCaP dalla flutamide libera in concentrazione pari alla sua massima solubilità in mezzo acquoso (10  $\mu$ M) rispetto alla stessa concentrazione di flutamide micellizzata in entrambi i sistemi polimerici. A parità di concentrazione, la flutamide micellizzata in entrambi i sistemi ha mostrato un effetto di inibizione della proliferazione cellulare indotta dal DHT maggiore rispetto a quello esercitato dalla flutamide libera (figura 39 a). In particolare si ha un incremento dell'effetto antiproliferativo pari a circa il 20% rispetto alla flutamide libera in quanto la micella consente all'intera quantità di flutamide caricata di raggiungere il recettore (AR) dove eserciterà l'azione antiproliferativa. Inoltre, quando le cellule LNCaP stimulate dal DHT, sono co-incubate con concentrazioni più alte di flutamide micellizzata in entrambi i sistemi polimerici (PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>3</sub> e PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>3</sub>) pari a 100-, 200-, 300-  $\mu$ M (figura 39 b), si osserva una drastica riduzione della vitalità cellulare (morte cellulare).

Quindi, è stato evidenziato che, a basse concentrazioni, sia la flutamide libera che micellizzata inibiscono la crescita delle cellule tumorali LNCaP la cui proliferazione è indotta dalla stimolazione del diidrotestosterone (DHT), mentre, ad alte concentrazioni, la flutamide micellizzata è in grado di indurre morte cellulare.

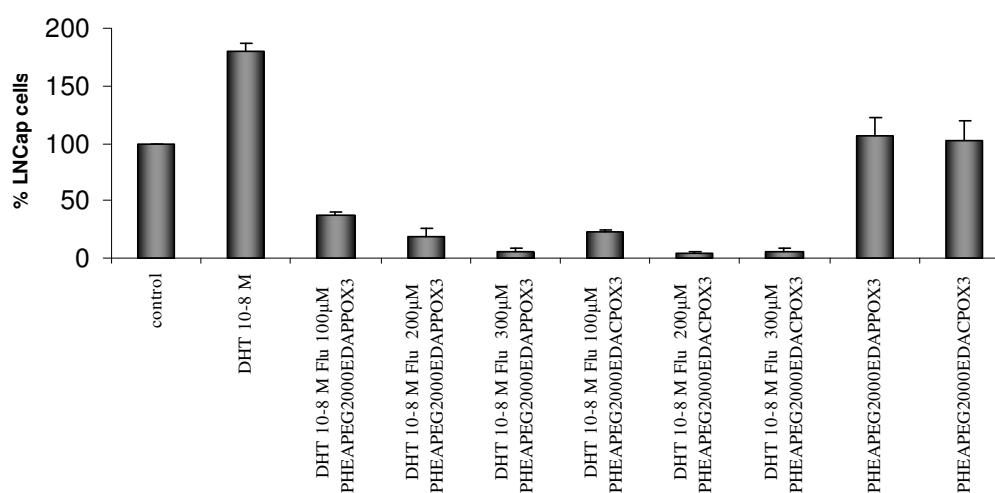
È stato inoltre evidenziato che le micelle non contenenti il farmaco, non inducono alcun effetto sulle cellule LNCaP, quindi l'effetto

antiproliferativo può essere attribuito solo all'attività farmacologica della flutamide.

(a)



(b)



**Figura 39.** Effetto sulla proliferazione delle cellule LNCaP esercitato dalla flutamide, sia libera che micellizzata, a basse concentrazioni (a) e ad alte concentrazioni (b)

### **3.1.11 Conclusioni**

È stata messa a punto la sintesi di nuovi copolimeri fluorurati anfifilici a struttura poliaspartammidica in grado di formare in mezzo acquoso sistemi auto-assemblanti potenzialmente utili per la veicolazione di farmaci lipofili.

Le strutture micellari hanno dimensioni di circa 50-70 nm e riescono ad incorporare con grande affinità farmaci fluorurati. In particolare, il farmaco scelto è stato la flutamide, avente una bassissima solubilità in acqua la quale viene incrementata di circa 27-30 volte in presenza dei sistemi micellari fluorurati.

I sistemi si sono rivelati stabili in fluidi fisiologici simulati e potenzialmente in grado di proteggere il farmaco da legami con le proteine plasmatiche, lasciando supporre una veicolazione per via parenterale.

È stata valutata l'azione antitumorale della flutamide micellizzata sulle cellule LNCaP di carcinoma prostatico in seguito a stimolazione della loro crescita con il DHT, rispetto alla flutamide non micellizzata e i risultati ottenuti hanno mostrato che, a basse concentrazioni, la flutamide micellizzata causa una significativa riduzione della loro proliferazione, invece, ad alte concentrazioni, induce morte cellulare. Quest'ultimo effetto molto importante è ottenibile solo con il farmaco micellizzato, in quanto solo in questa forma è possibile ottenere più alte concentrazioni di esso in un mezzo acquoso e quindi avvalorare l'importanza dei sistemi micellari studiati.

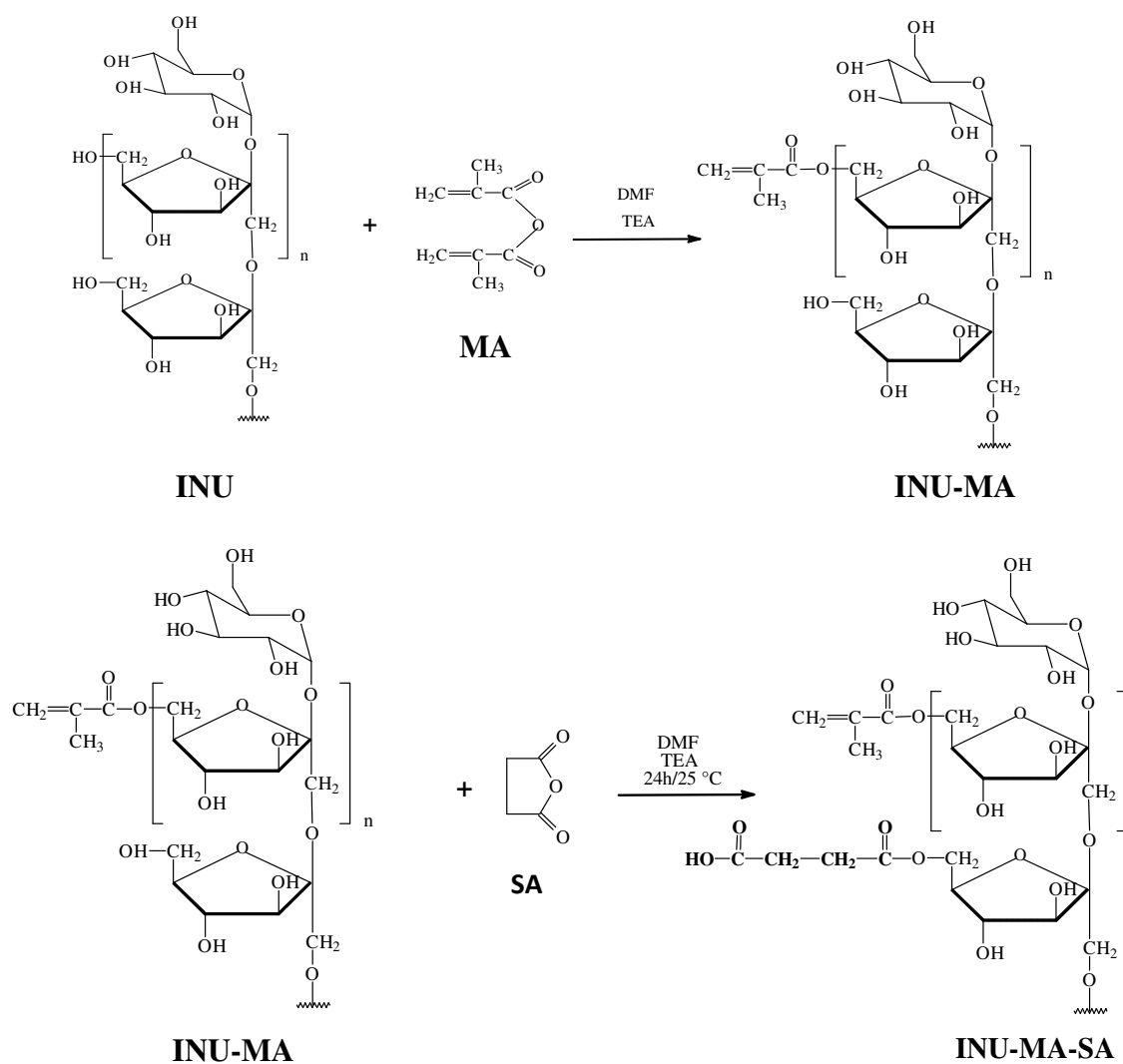


## **3.2 SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DI IDROGELI pH-SENSIBILI A BASE DI INULINA**

### **3.2.1 Sintesi e caratterizzazione dell'INUMASA**

Al fine di ottenere un derivato in grado di formare network polimerici sensibili al pH, l'inulina (INU) è stata derivatizzata con l'anidride metacrilica (MA) e con l'anidride succinica (SA). La reazione è stata condotta in N,N-dimetilformammide anidra (DMF) usando la trietilammina (TEA) come catalizzatore (schema 7).

Il derivato INUMASA ottenuto è stato caratterizzato mediante studi FT-IR, <sup>1</sup>H-NMR e SEC come descritto in precedenti lavori [*Tripodo G. et al., 2005*]. Tali studi hanno confermato l'ottenimento del prodotto voluto e hanno permesso di determinare il grado di derivatizzazione (DD) in gruppi metacrilici e succinici rispettivamente pari a 22% mol/mol e 11% mol/mol.



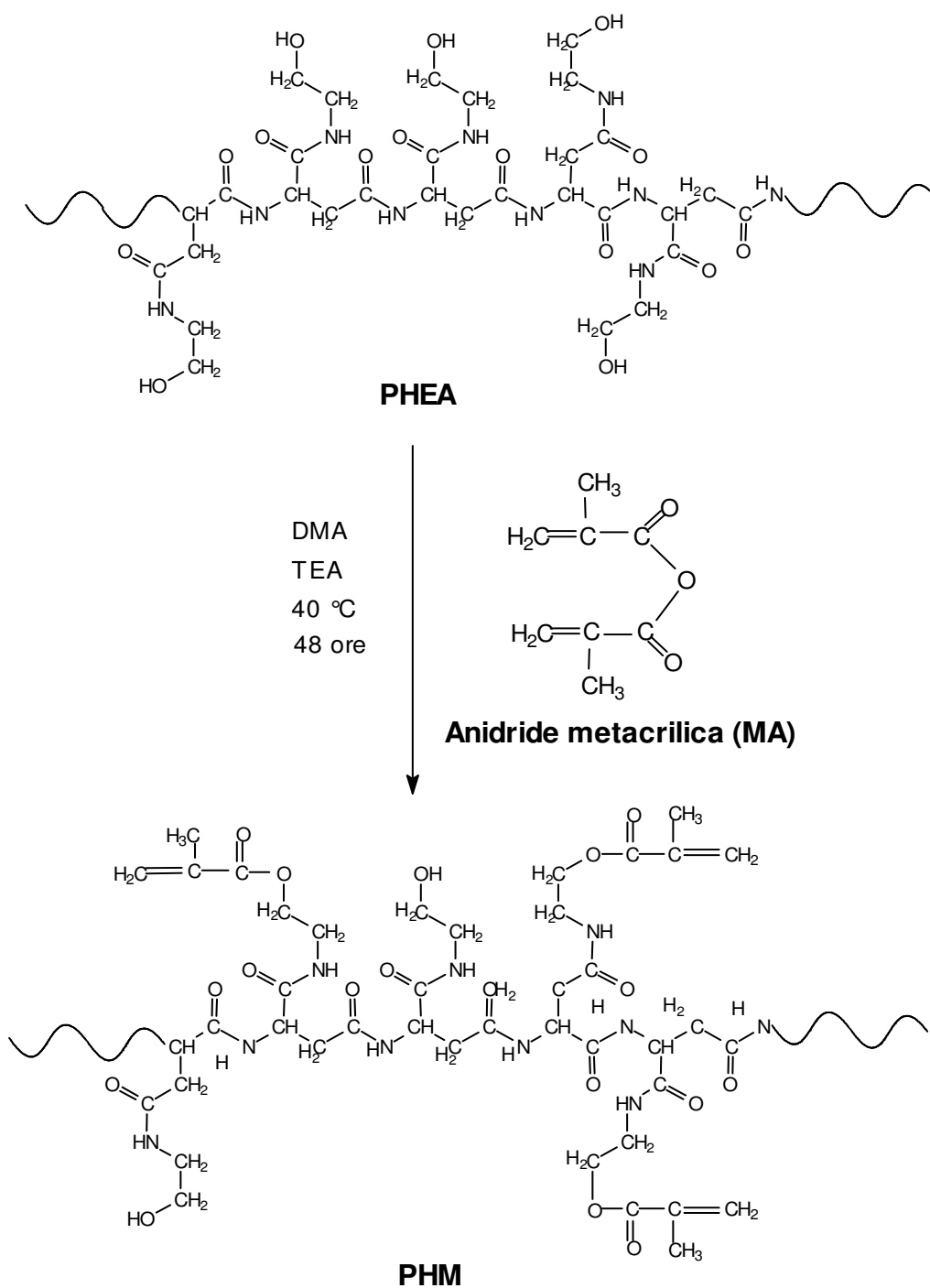
**Schema 7.** Schema di reazione dell'INUMASA

### **3.2.2 Sintesi e caratterizzazione del PHM**

L'INUMASA è stata impiegata nella formazione di idrogeli compositi con polimeri sintetici, in particolare è stato scelto un derivato metacrilato del PHEA, siglato come PHM.

La sintesi del PHM avviene per reazione tra i gruppi ossidrilici del PHEA e l'anidride metacrilica in dimetilacetammide anidra e mediante l'utilizzo di trietilammina (TEA) come catalizzatore (schema 8).

Il derivato ottenuto (PHM) è stato caratterizzato mediante analisi FT-IR, <sup>1</sup>H-NMR e SEC come descritto in precedenti lavori [Mandrachia D. et al., 2004]. Il prodotto ha mostrato un DD in gruppi metacrilici pari a 30% mol/mol.



**Schema 8.** Sintesi del derivato PHM

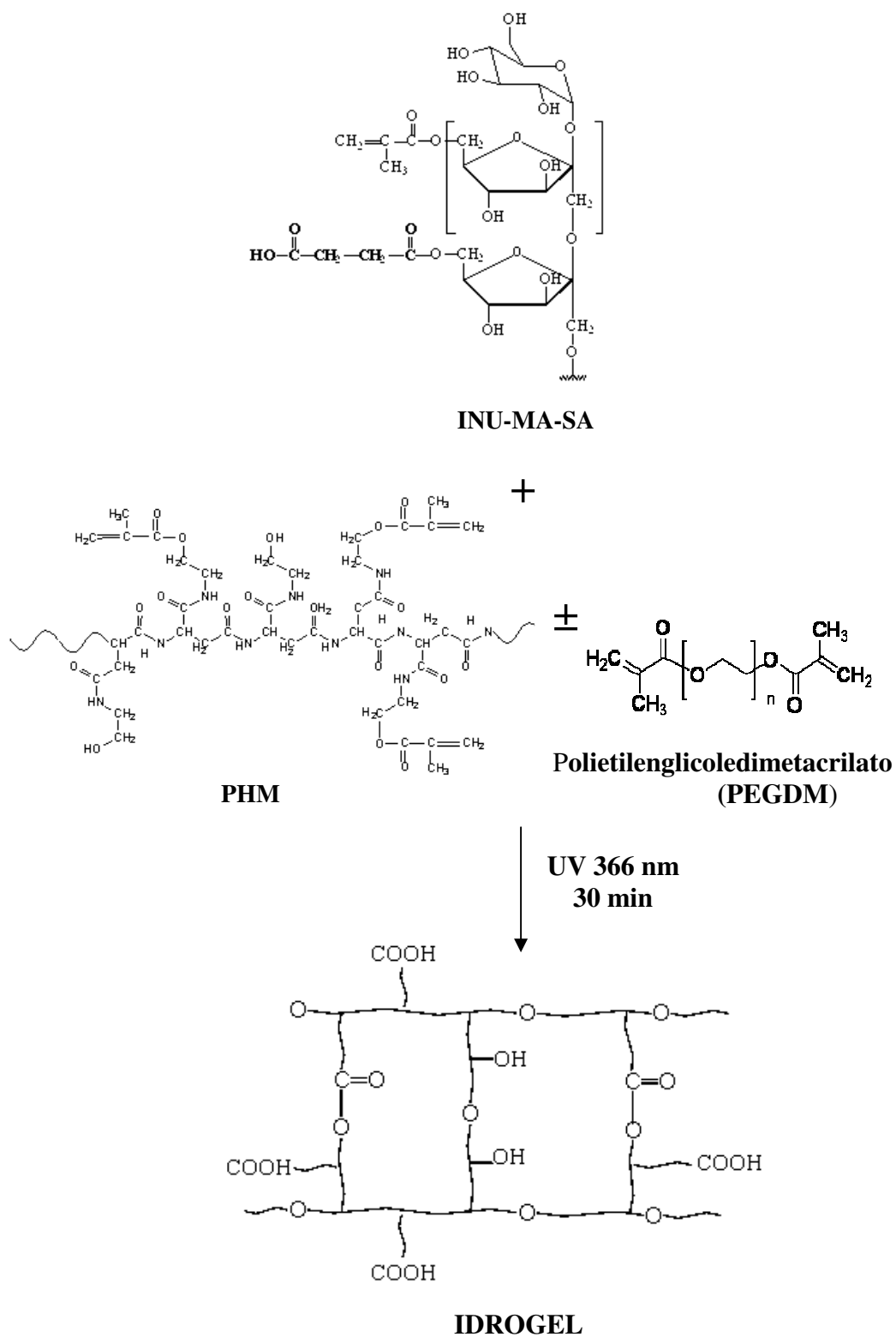
### **3.2.3 Preparazione degli idrogeli INUMASA/PHM o INUMASA/PHM/PEGDM mediante irradiazione UV e loro caratterizzazione**

Al fine di ottenere un sistema reticolato, INUMASA e PHM in soluzione di tampone fosfato a pH 6.8, nel rapporto 70:30 p/p, sono stati sottoposti a irradiazione UV in presenza o in assenza di poli(etilene glicole)dimetacrilato PM $\approx$ 550 (PEGDM) 8% p/p rispetto al peso totale di entrambi i polimeri; la concentrazione dei polimeri è stata mantenuta a 150 mg/ml.

La reazione di reticolazione è stata eseguita in un reattore UV fornito di 16 lampade che emettono alla lunghezza d'onda di 366 nm; una tale radiazione a lunghezza d'onda relativamente alta (bassa energia) e il breve tempo di irradiazione (30 min) sono parametri importanti per minimizzare la possibile degradazione dei polimeri durante l'irradiazione UV e, più importante, la degradazione del farmaco proteico che si vuole incorporare.

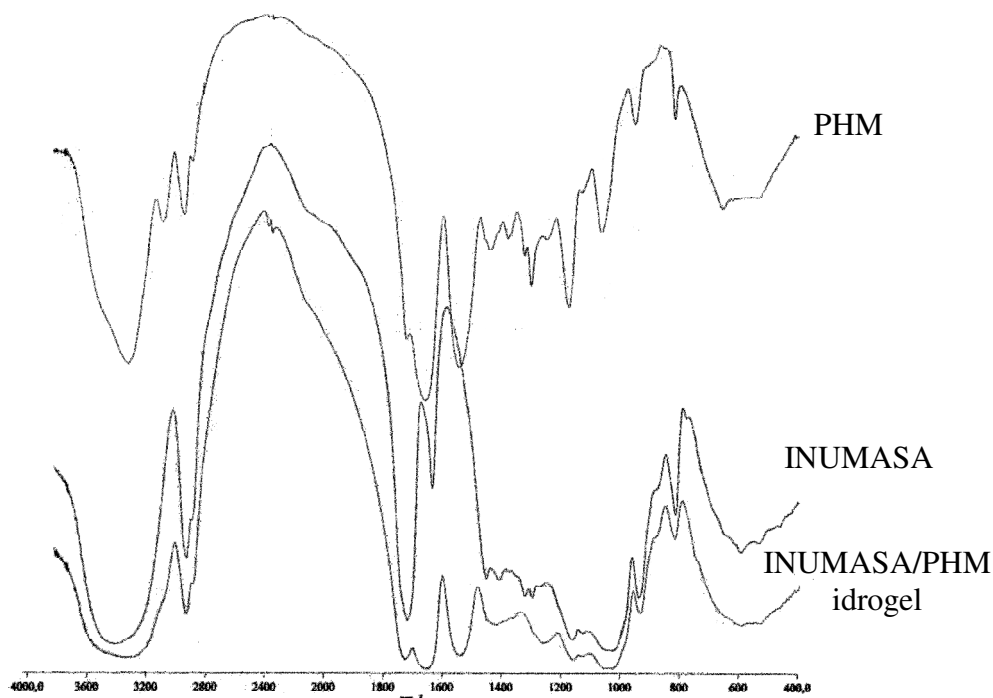
L'irradiazione della soluzione dei polimeri, schematizzata nello schema 9, ha portato a idrogeli soffici e quasi trasparenti che sono stati caratterizzati mediante FT-IR, studi di rigonfiamento dinamici, e mediante studi di degradazione enzimatica con inulinasi.

Gli idrogeli preparati sono risultati insolubili in acqua, in tamponi acquosi e nei comuni solventi organici, in accordo alla formazione di reticoli chimici.



**Schema 9:** Preparazione di idrogeli a base di INUMASA/PHM in assenza o in presenza di PEGDM

Lo spettro FT-IR dell'idrogel INUMASA/PHM (figura 40) paragonato a quello dei derivati PHM e INUMASA, ha mostrato la scomparsa della banda a 1298 e 1304  $\text{cm}^{-1}$  dovuta al completo consumo dei doppi legami dei residui metacrilici sia di INUMASA che di PHM dopo irradiazione UV. Questo risultato è importante perché conferma che le condizioni di reazione usate portano alla completa reticolazione del sistema, ovvero dopo il processo di irraggiamento non rimane nessun doppio legame reattivo.



**Figura 40.** Spettri FT-IR di PHM, INUMASA e dell' idrogel INUMASA/PHM

### 3.2.4 Studi di *swelling*

Gli studi di rigonfiamento dinamici degli idrogeli INUMASA/PHM e INUMASA/PHM/PEGDM sono stati eseguiti in diversi mezzi: acqua bidistillata per 24 ore, HCl 0.1 N (pH 1.0) per 2 ore e dopo tampone

fosfato (PBS) a pH 6.8 per 24 ore. I risultati sono riportati nella tabella 6.

**Tabella 6.** Valori del grado di rigonfiamento in peso,  $q$ , determinati in acqua bidistillata per 24 ore, in HCl 0.1 N (pH 1.0) per 2 ore e dopo in tampone fosfato (PBS) pH 6.8 per 24 ore

| Campione          | Grado di rigonfiamento in peso, $q$ |                    |                 |                 |
|-------------------|-------------------------------------|--------------------|-----------------|-----------------|
|                   | Tempo (ore)                         | Mezzo              |                 |                 |
|                   |                                     | Acqua bidistillata | HCl pH 1.0      | PBS pH 6.8      |
| INUMASA/PHM       | 1                                   | $2.40 \pm 0.10$    | $2.00 \pm 0.10$ |                 |
|                   | 2                                   | $4.40 \pm 0.11$    | $3.30 \pm 0.12$ |                 |
|                   | 7                                   | $4.52 \pm 0.20$    |                 | $4.00 \pm 0.12$ |
|                   | 24                                  | $4.52 \pm 0.13$    |                 | $4.01 \pm 0.10$ |
| INUMASA/PHM/PEGDM | 1                                   | $2.80 \pm 0.15$    | $2.20 \pm 0.10$ |                 |
|                   | 2                                   | $4.89 \pm 0.20$    | $3.90 \pm 0.15$ |                 |
|                   | 7                                   | $5.10 \pm 0.21$    |                 | $4.48 \pm 0.10$ |
|                   | 24                                  | $5.10 \pm 0.14$    |                 | $4.63 \pm 0.11$ |

Entrambi gli idrogeli hanno una buona affinità per i mezzi acquosi e un rigonfiamento pH sensibile dovuto alla presenza dei residui acidi succinici nel copolimero INUMASA.

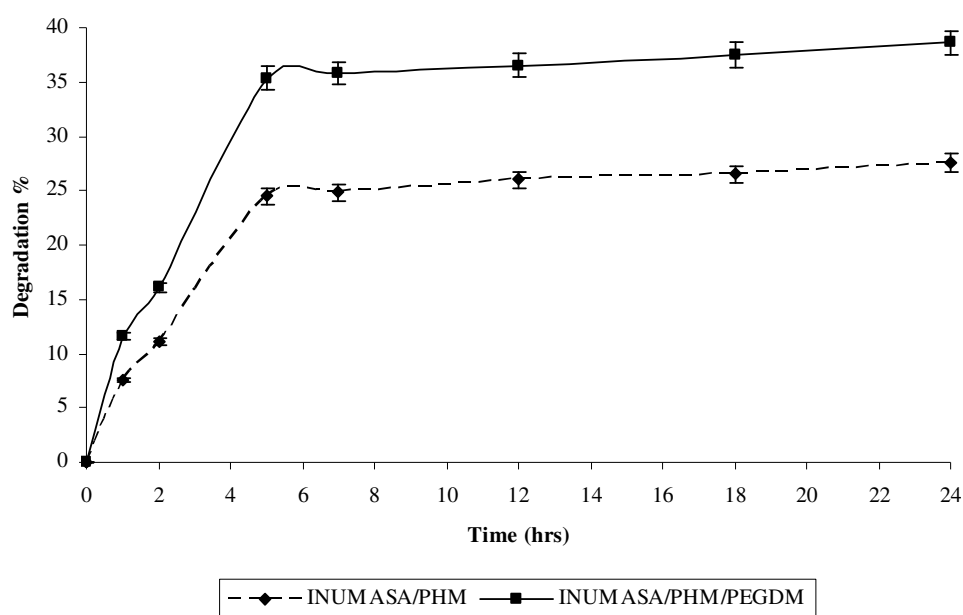
Il rigonfiamento in PBS pH 6.8 ha mostrato, come previsto, un valore più basso di quello osservato in acqua distillata probabilmente a causa della forza ionica di questo mezzo. Inoltre, in tutti i mezzi, l'idrogel INUMASA/PHM/PEGDM rigonfia di più dell'idrogel INUMASA/PHM probabilmente a causa della presenza delle catene di PEG che sono idrofile (quindi aumentano l'affinità per il mezzo



acquoso) e, che grazie alla loro struttura macromolecolare, riducono la compattezza del reticolo, migliorando cioè l'assorbimento di acqua.

### 3.2.5 Studi di degradazione enzimatica

Per valutare la biodegradabilità di questi materiali, gli idrogeli ottenuti sono stati sottoposti a degradazione enzimatica con inulinasi.



**Figura 41.** Degradazione enzimatica % degli idrogeli INUMASA/PHM e INUMASA/PHM/PEGDM

La figura 41 mostra una degradazione apprezzabile dovuta all'attività dell'enzima su entrambi gli idrogeli; questo risultato è molto importante perché è noto in letteratura che i prodotti di degradazione dell'inulina promuovono nel colon il miglioramento di malattie come il morbo di Crohn e la colite ulcerosa [Casellas F. et al., 2007; Guarner F., 2005].

### 3.2.6 Compatibilità cellulare degli idrogel INUMASA/PHM e INUMASA/PHM/PEGDM

I test di compatibilità cellulare sono una valida prova della biocompatibilità di un materiale. In particolare è possibile determinare se un materiale causa effetti acuti su cellule isolate.

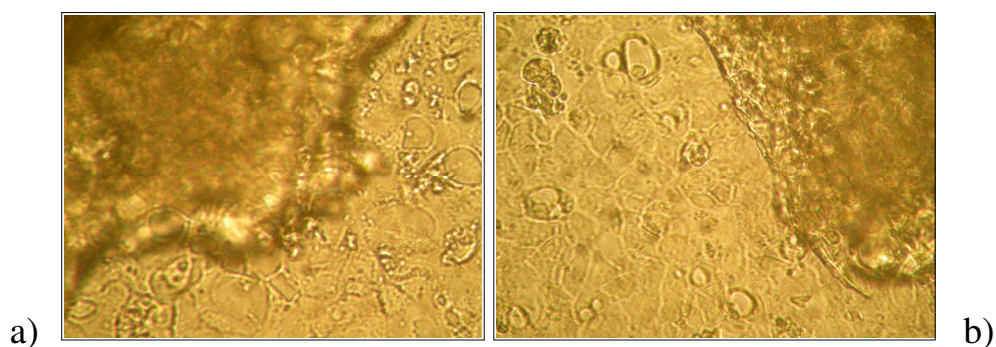
Al fine di valutare la compatibilità cellulare degli idrogeli INUMASA/PHM e INUMASA/PHM/PEGDM, sono stati eseguiti test su cellule Caco-2 scelte come modello di linea cellulare intestinale. Per questo scopo sono stati usati due metodi: *diretto* e *indiretto*. Il primo consiste nel contatto diretto dell'idrogel con le cellule, mentre il secondo consiste nel valutare la compatibilità cellulare del mezzo condizionato dall'idrogel.

In particolare, nel test diretto, gli idrogeli INUMASA/PHM o INUMASA/PHM/PEGDM sono stati direttamente incubati per 48 ore con le cellule Caco-2 per valutare la loro compatibilità cellulare. Il test indiretto è stato compiuto per valutare se le cellule sono compatibili, dopo una incubazione per 48 ore, con un mezzo di coltura dove gli idrogeli INUMASA/PHM e INUMASA/PHM/PEGDM sono stati precedentemente incubati per 5 giorni.

Le analisi morfologiche delle cellule hanno mostrato che il contatto diretto di entrambi gli idrogeli con lo strato di cellule, dopo 48 ore, non incide in maniera negativa sulla vitalità cellulare. Infatti, le cellule mantengono il contatto con l'idrogel così come con le cellule adiacenti, inoltre, mostrano una regolare morfologia cellulare se paragonate con il controllo.

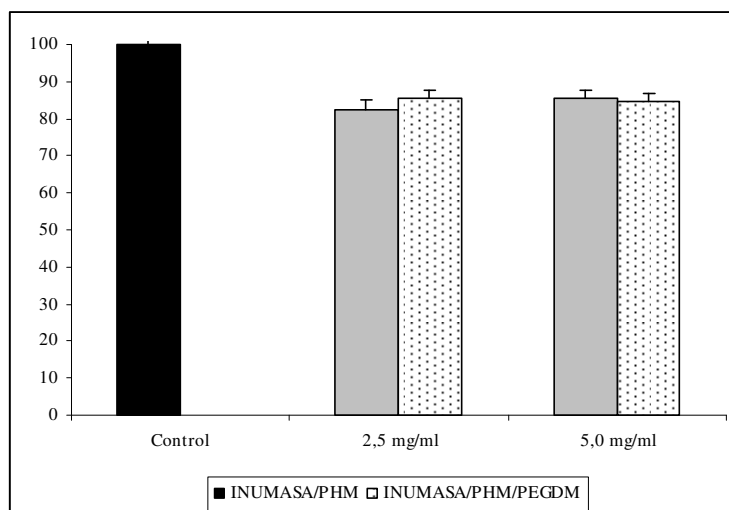
Come mostrato in figura 42, nessuna contrazione o distacco del monostrato di cellule è evidenziabile intorno agli idrogeli; questo dimostra chiaramente una totale assenza di tossicità di questi materiali

sulle cellule Caco-2. Gli stessi risultati sono stati ottenuti per i test indiretti.

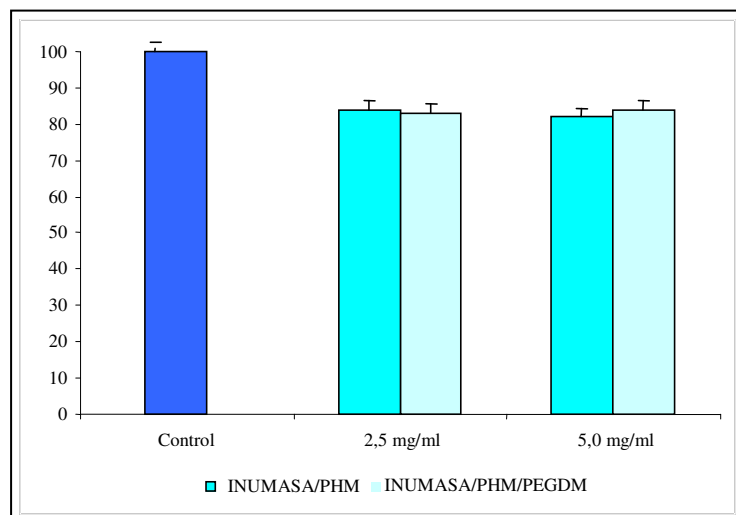


**Figura 42:** Analisi morfologiche di un monostrato di cellule Caco-2 dopo contatto diretto per 48 ore con gli idrogeli INUMASA/PHM (a) o INUMASA/PHM/PEGDM (b)

La vitalità cellulare è stata valutata con il test MTS e i risultati sono mostrati in figura 43 e 44, per il test diretto e indiretto, rispettivamente.



**Figura 43.** Vitalità cellulare valutata con il test MTS dopo 48 ore di incubazione con due differenti quantità degli idrogeli INUMASA/PHM e INUMASA/PHM/PEGDM: test diretto



**Figura 44.** Vitalità cellulare valutata con il test MTS dopo 48 ore di incubazione con due differenti quantità degli idrogeli INUMASA/PHM e INUMASA/PHM/PEGDM: test indiretto.

E' evidente che gli idrogeli INUMASA/PHM e INUMASA/PHM/PEGDM non causano variazioni significative della vitalità cellulare dopo il loro contatto diretto con le cellule così come i loro prodotti di degradazione non interferiscono, in maniera negativa, con la vitalità delle cellule, cioè, questi materiali sono privi (o contengono quantità non significative) di sostanze estraibili biologicamente pericolose.

### 3.2.7 Effetti dell'irraggiamento sulle IgG e loro caricamento negli idrogeli

Con lo scopo di valutare la capacità di caricamento e di rilascio di questi idrogeli, le IgG umane sono state caricate mediante incorporazione durante irraggiamento UV.

Gli studi di stabilità sono stati condotti sulle IgG prima dell'incorporazione. In particolare, 100  $\mu$ l di una soluzione 10 mg/ml di IgG in PBS pH 6.8 diluiti con PBS fino a 1 ml, sono stati irradiati

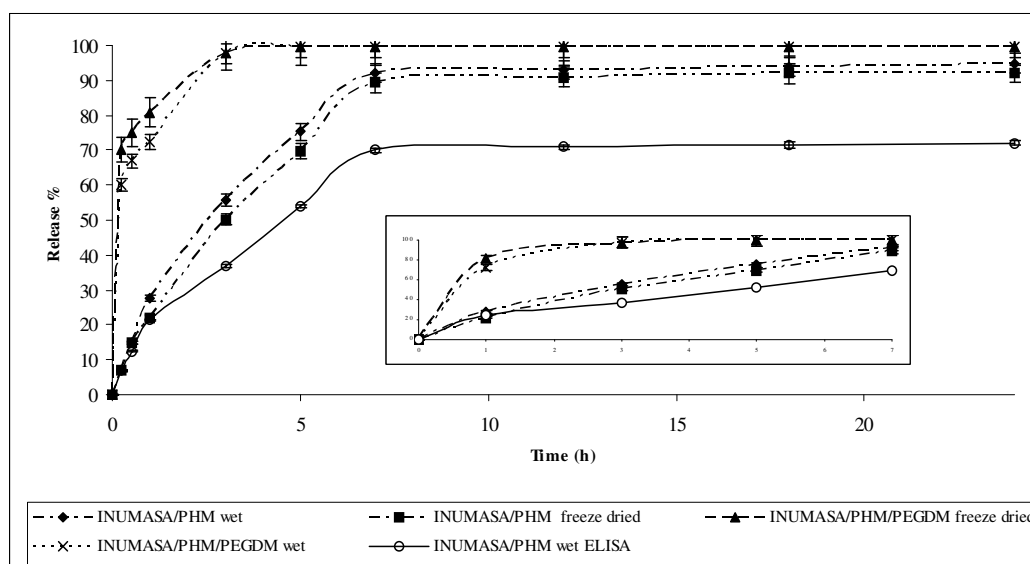
per 5, 15, 30, 45, 60 o 120 minuti a 366 nm; la stabilità è stata valutata tramite studi UV e SE-HPLC. Gli studi UV non hanno mostrato variazioni significative dello spettro a ciascun tempo di irradiazione, infatti, hanno mostrato due picchi a 220 e 280 nm, con nessuna riduzione o incremento in assorbanza. L'analisi SE-HPLC, al contrario, ha rivelato sostanziali differenze tra i vari campioni di IgG irradiati a diversi tempi. Il cromatogramma della soluzione standard di IgG non irradiate ha mostrato un picco a 19 minuti, lo stesso picco che è stato trovato per le soluzioni di IgG irradiate per 5, 15, e 30 min indicando così che nessun fenomeno di instabilità è sopraggiunto a carico delle immunoglobuline .

Per un tempo di irradiazione UV pari a 45, 60 o 120 min, nei cromatogrammi è apparso un altro picco a 15 min. Questo picco è ascrivibile alla presenza di specie in soluzione a più alto peso molecolare, probabilmente dovute all'aggregazione delle IgG.

Poiché l'area di questo picco di aggregazione aumenta da 45 a 120 min di irradiazione, questo risultato indica che più lungo è il tempo di irradiazione maggiore è l'aggregazione delle IgG in soluzione. E' importante sottolineare che al tempo di irradiazione scelto per la formazione dell'idrogel, ovvero 30 min, non si verifica alcun fenomeno aggregativo. Così, il caricamento delle IgG negli idrogeli è stato eseguito durante la reticolazione UV dissolvendo sia le IgG che i polimeri in PBS pH 6.8 e irradiando le soluzioni per 30 min a 366 nm.

### 3.2.8 Studi di rilascio delle IgG dagli idrogeli INUMASA/PHM e INUMASA/PHM/PEGDM

Gli studi di rilascio sono stati eseguiti su entrambi gli idrogeli, liofilizzati o no, a pH 6.8 fino a 24 ore. La quantità di IgG rilasciate è stata valutata mediante studi SE-HPLC e ELISA.



**Figura 45.** Studi di rilascio delle IgG dagli idrogeli INUMASA/PHM o INUMASA/PHM/PEGDM rigonfi (wet) o liofilizzati (freeze dried) eseguiti con SE-HPLC o ELISA; nel particolare, il profilo di rilascio fino a 7 ore

Come mostrato in figura 45 il rilascio delle IgG dagli idrogeli, valutato tramite SE-HPLC, differisce notevolmente per gli idrogeli INUMASA/PHM e INUMASA/PHM/PEGDM.

L'idrogel INUMASA/PHM/PEGDM ha mostrato un pronunciato burst effect; circa il 70 % della proteina incorporata è stata rilasciata in 15 min e il rilascio è stato completato dopo 3 ore, mentre è stata osservata una leggera differenza nella quantità rilasciata tra gli idrogeli secchi e rigonfi. Questo risultato conferma che il processo di liofilizzazione non interferisce sul rilascio delle IgG dalle matrici.

Per quanto riguarda l'idrogel INUMASA/PHM, esso determina un buon profilo di rilascio, infatti, fino alle 7 ore il rilascio segue una cinetica all'incirca di ordine zero suggerendo così che il rilascio è governato dalla diffusione del soluto attraverso la matrice, inoltre, anche in questo caso, solo una leggera differenza può essere apprezzata tra l'idrogel secco e quello rigonfio. I valori di rilascio in PBS pH 6.8 sono in accordo con quelli di *swelling*; evidentemente la maggiore capacità di *swelling* dell'idrogel INUMASA/PHM/PEGDM, anche se non molto pronunciata rispetto all'idrogel INUMASA/PHM, facilita la diffusione delle proteine (probabilmente la presenza delle catene di PEG diminuisce la compattezza del reticolo e aumenta la permeabilità alla proteina).

Prendendo in considerazione il buon profilo di rilascio dell'idrogel INUMASA/PHM, gli stessi studi di rilascio sono stati eseguiti mediante ELISA per valutare la quantità delle IgG rilasciate. Questo metodo permette di valutare le IgG rilasciate e, considerando che solo le IgG attive possono legarsi a specifici antigeni legati sulle piastre ELISA, si può valutare quanto delle IgG rilasciate è ancora biologicamente attiva dopo irradiazione UV e rilascio dalla matrice.

I risultati riportati in figura 45, confermano chiaramente che le IgG rilasciate mantengono la loro attività biologica, cioè, la procedura usata per ottenere l'idrogel e i successivi rilasci, non interferiscono con l'integrità e la stabilità delle IgG rilasciate.

### **3.2.9 Conclusioni**

Nuovi idrogeli compositi sono stati valutati come sistemi per il rilascio di proteine terapeutiche da impiegare nella terapia di malattie infiammatorie intestinali. In particolare due idrogeli sono stati testati per la loro capacità di intrappolare e rilasciare le IgG scelte come modello di anticorpo monoclonale.

Gli idrogeli, basati sull'inulina derivatizzata con anidride metacrilica e succinica (INUMASA) e sulla poliidrossietilaspartammide derivatizzata con anidride metacrilica (PHM), sono stati ottenuti usando condizioni blande di irraggiamento all'UV (soluzione tampone fosfato pH 6.8, 366 nm, 30 min, assenza di iniziatori tossici) in presenza o in assenza di polietilenglicoldimetacrilato (PEGDM<sub>550</sub>). Grazie a queste condizioni di reazione, è stato possibile incorporare le IgG durante la reazione di *crosslinking*, senza che si verifici alcuna degradazione della proteina. Gli idrogeli INUMASA/PHM e INUMASA/PHM/PEGDM hanno rilasciato le IgG incorporate in maniera controllata. Gli esperimenti di rilascio sono stati eseguiti prima o dopo liofilizzazione degli idrogeli e in entrambi i casi le IgG rilasciate risultano attive, come mostrato dai test ELISA. Inoltre, gli idrogeli preparati hanno mostrato un'elevata compatibilità cellulare come evidenziato dagli studi *in vitro* condotti sulle cellule Caco-2 scelte come modello di cellule intestinali.

Tutti i risultati ottenuti suggeriscono che gli idrogeli preparati rappresentano dei potenziali candidati per trasportare e rilasciare farmaci proteici, quali anticorpi monoclonali, lungo il tratto intestinale per il trattamento di patologie infiammatorie, come il morbo di Crohn.

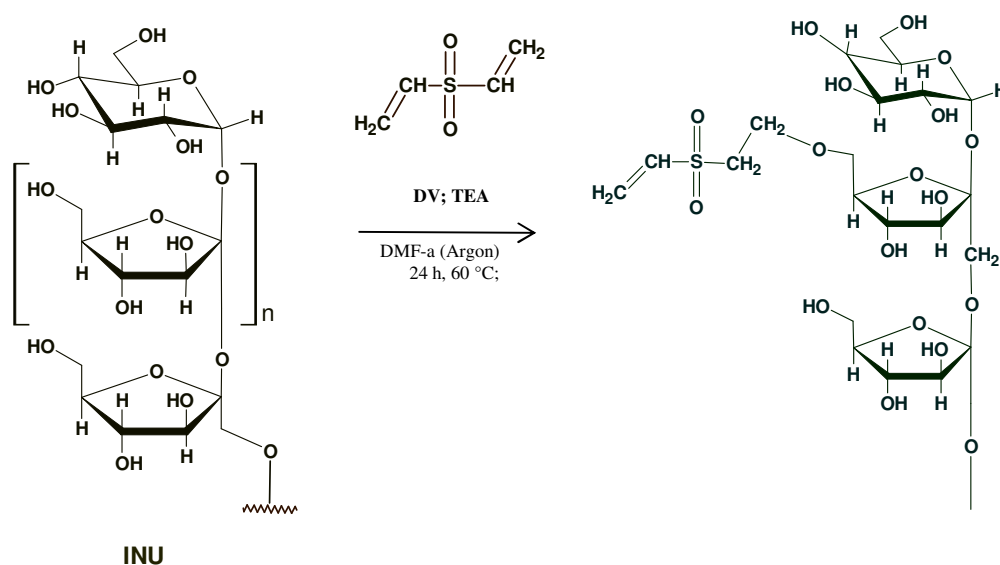


### **3.3 SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DI IDROGELI A BASE DEL DERIVATO DIVINILSULFONICO DELL'INULINA PER LA VEICOLAZIONE DI FARMACI LIPOFILI**

#### **3.3.1 Caratterizzazione dell'INUDV**

Al fine di ottenere un derivato dell'inulina (INU) in grado di reagire con molecole nucleofile per la produzione di idrogeli chimici, il polisaccaride è stato derivatizzato con divinil sulfone (DV). In letteratura sono riportati diversi esempi di idrogeli ottenuti mediante *cross-linking* fra gruppi amminici o gruppi tiolici e polimeri portanti gruppi vinilsulfonici [Wacker B.K. *et al.*, 2006; Qui B. *et al.*, 2003], ma non ci sono esempi di idrogeli preparati a partire da derivati sulfonici dell'inulina e catene di polietilenglicole contenenti gruppi amminici.

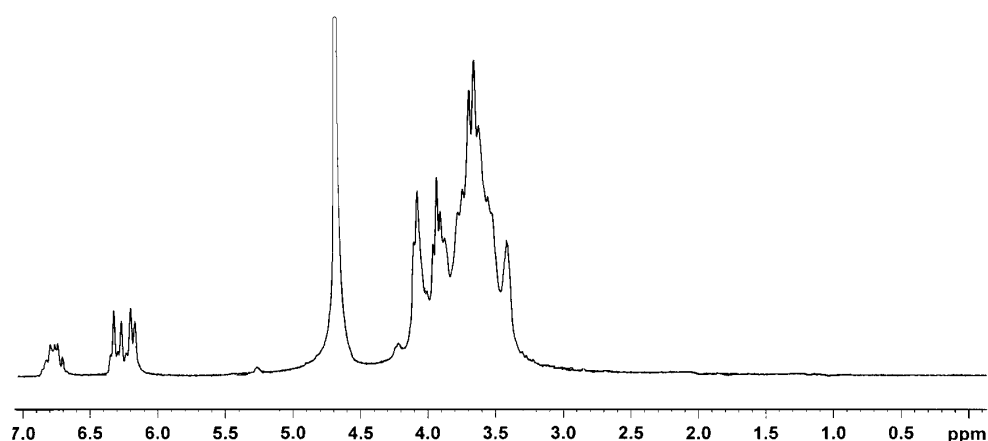
In particolare, la derivatizzazione dell'inulina con il divinil sulfone è stata condotta in solvente organico utilizzando la trietilammina (TEA) come catalizzatore. Lo schema di reazione è di seguito riportato (schema 10).



**Schema 10.** Schema di sintesi del derivato INUDV

Il derivato INUDV, così ottenuto, è stato caratterizzato mediante  $^1\text{H}$  NMR, FT-IR e analisi SEC.

Lo spettro  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ) ha mostrato due picchi a:  $\delta$  6.21 (2H, m:  $\text{CH}_2=$ ) e 6.77 (1H, m:  $=\text{CH-}$ ) relativi al legame del vinil sulfone all'inulina (vedi figura 46). Il grado di derivatizzazione molare (DD %) in divinil sulfone (DV) è stato determinato mediante  $^1\text{H}$  NMR, come riportato nella parte sperimentale, ed è risultato pari a  $25 \pm 3 \%$  mol/mol.



**Figura 46.** Spettro  $^1\text{H}$ NMR del derivato vinilsulfonico dell'inulina (INUDV)

Lo spettro FT-IR (KBr) mostra dei picchi che confermano la formazione del derivato INUDV (vedi parte sperimentale).

La determinazione dei pesi molecolari effettuata mediante *Size Exclusion Chromatography* (SEC), ha rivelato un valore di peso molecolare del derivato INUDV pari a 7.5 kDa con un indice di polidispersità pari a 1.1, maggiore rispetto a quello dell'inulina di partenza, pari a 5.0 kDa e con un indice di polidispersità pari a 1.2. Questo dato conferma pertanto che non avviene alcuna degradazione del *backbone* polimerico dell'inulina durante la reazione con il divinil sulfone.

### 3.3.2 Preparazione degli idrogeli INUDV/PEGBa e loro caratterizzazione

La reazione di *crosslinking* dell'INUDV con O,O'-Bis(2-aminoetil)polietileneglicole (PEGBa) è stata condotta a temperatura ambiente e in tampone fosfato (PBS) pH 7.4; la reazione va a completezza in 4 ore e non prevede l'utilizzo di alcun iniziatore chimico.

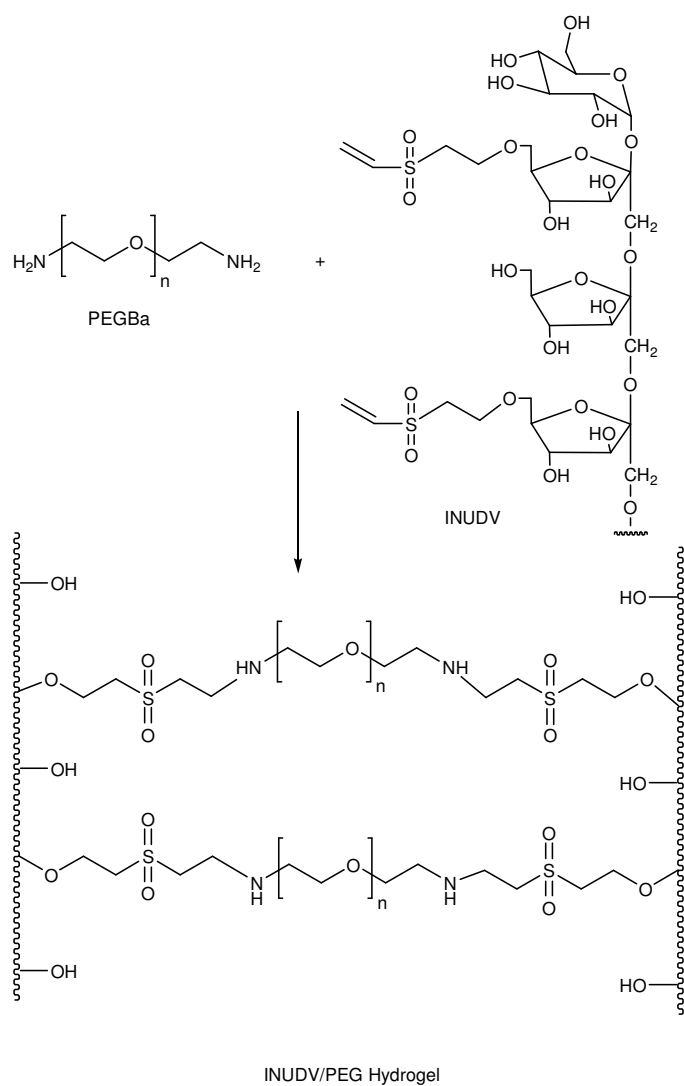
Sono state utilizzate tre diverse quantità di PEGBa rispetto alle moli di DV presenti nell'unità ripetitiva dell'INUDV, secondo rapporti :

$$Z = \frac{\text{moli di PEGBa}}{\text{moli di unità ripetitive di INUDV funzionalizzate con gruppi divinilsulfonici}} = 0.5; 0.8; 1$$

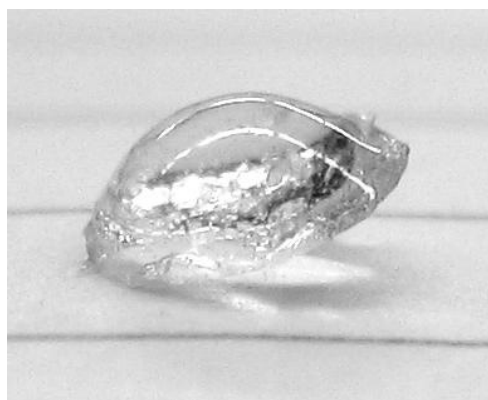
considerando un grado di derivatizzazione in moli di divinil sulfone nel derivato INUDV pari a  $25 \pm 3$  % mol/mol calcolato tramite  $^1\text{H}$ NMR.

Gli idrogel ottenuti, denominati INUDV/PEGBa-A, INUDV/PEGBa-B e INUDV/PEGBa-C con  $Z = 0.5, 0.8, 1$  rispettivamente, sono stati caratterizzati tramite analisi FT-IR, studi di *swelling* condotti in vari mezzi e studi di idrolisi chimica ed enzimatica.

Lo Schema 11 mostra la formazione dell'idrogel INUDV/PEGBa e la figura 47 mostra come esempio, l'idrogel INUDV/PEGBa-B che appare omogeneo, trasparente e incolore.



**Schema 11.** Formazione dell'idrogel INUDV/PEGBa

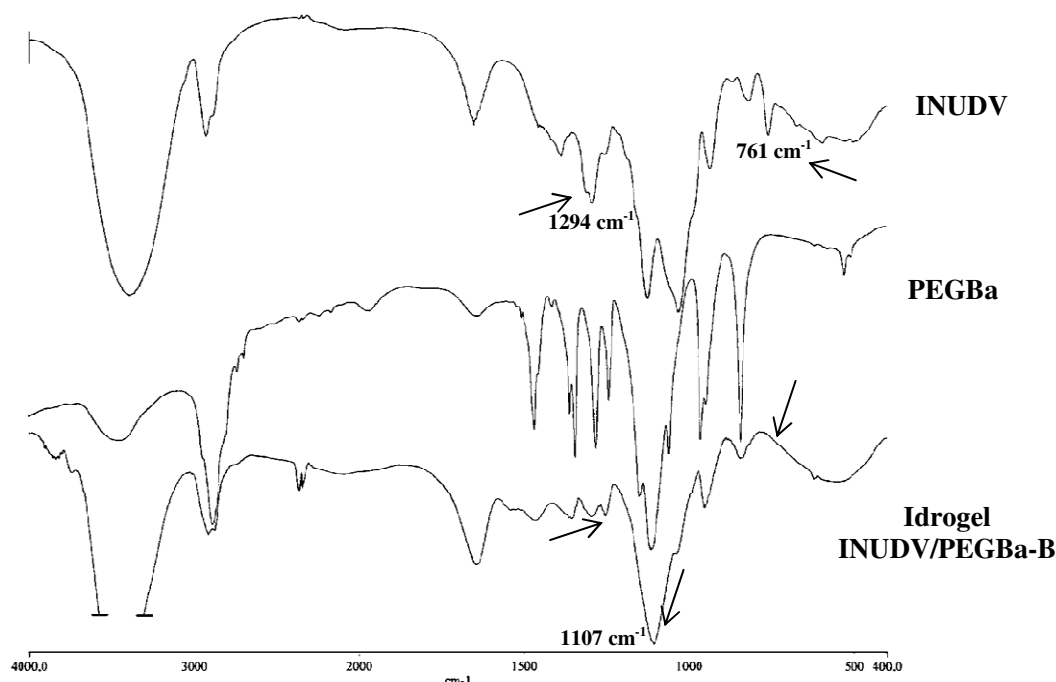


**Figura 47.** Idrogel INUDV/PEGBa-B

Lo spettro FT-IR degli idrogeli INUDV/PEGBa-A, INUDV/PEGBa-B e INUDV/PEGBa-C ha mostrato la scomparsa del picco a  $761\text{ cm}^{-1}$  appartenente al *wagging* del doppio legame vinilico dell' INUDV, indicando così che la reazione di *crosslinking* coinvolge l'apertura di questi doppi legami.

Un altro picco importante, utile per dimostrare il *crosslinking* chimico, è il segnale a  $1294\text{ cm}^{-1}$  (*scissoring*  $-\text{C}=\text{CH}_2$ ); in questo caso è possibile evidenziare una notevole riduzione dell'intensità del picco, ma a causa della sovrapposizione del picco del PEG a  $1290\text{ cm}^{-1}$ , non è possibile osservare la sua completa scomparsa dopo il *crosslinking*.

Un'altra evidenza del *crosslinking* è la comparsa, nello spettro degli idrogeli, di un picco intenso e grande a  $1107\text{ cm}^{-1}$  relativo allo *stretching* C-O del PEG (figura 48).

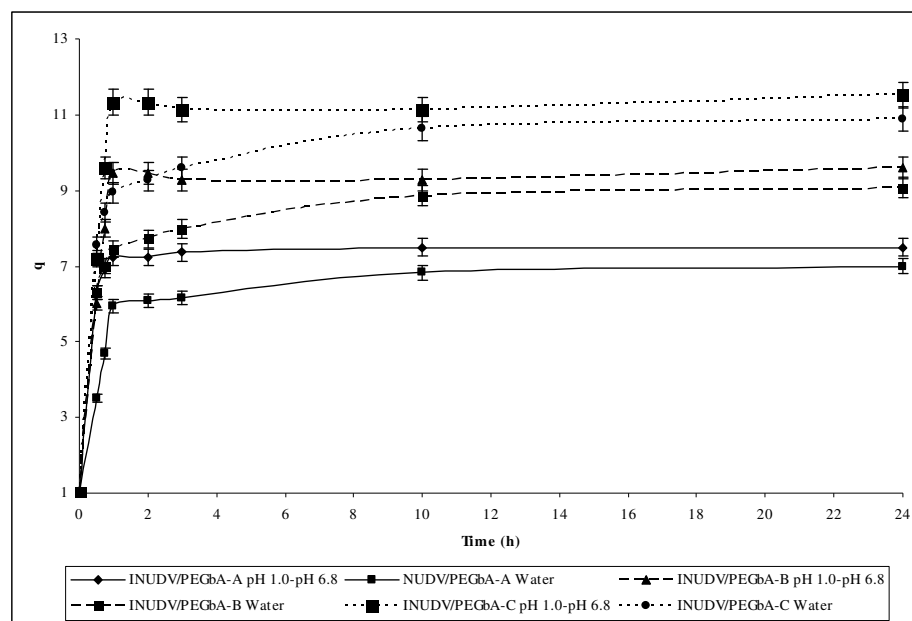


**Figura 48:** Spettri FT-IR di INUDV, PEGBa, INUDV/PEGBa-B

La resa degli idrogeli ottenuti è pari a 65, 80 e 90% (p/p) rispettivamente per INUDV/PEGBa-A, INUDV-PEGBa-B, INUDV/PEGBa-C, quindi, come atteso, la resa aumenta all'aumentare della quantità di PEGBa.

### 3.3.3 Studi di *swelling* sulla matrice vuota

La capacità di *swelling* di ogni idrogel è molto importante in quanto influenza proprietà come le interazioni con le superfici biologiche, le proprietà meccaniche, l'assorbimento e la diffusione dei soluti, ecc. Per questi motivi, gli studi di *swelling* sono stati condotti in acqua bidistillata per 24 ore, in HCl pH 1.0 (fluido gastrico simulato) per 2 ore e in tampone fosfato PBS pH 6.8 (fluido intestinale simulato) fino alle 24 ore. I risultati sono mostrati in figura 49.



**Figura 49.** Studi di *swelling* dinamico per gli idrogeli liofilizzati INUDV/PEGBa-A, INUDV/PEGBa-B and INUDV/PEGBa-C in acqua bidistillata per 24 ore, soluzione di HCl pH 1.0 (simulante il fluido gastrico) e in soluzione tampone fosfato pH 6.8 (simulante il fluido intestinale) fino alle 24 ore

Tutti gli idrogeli studiati hanno mostrato alta affinità verso il mezzo acquoso, e non è stata osservata alcuna differenza di affinità in seguito a variazioni di pH del mezzo da 1.0 a 6.8, in accordo all'assenza di gruppi ionizzabili nel campione.

È stato osservato il seguente andamento nel comportamento di *swelling*: INUDV/PEGBa-C>INUDV/PEGBa-B>INUDV/PEGBa-A, confermando così che il carattere idrofilo dell'agente di *crosslinking* PEGBa induce un aumento dello *swelling* dell'idrogel che sarà tanto più grande quanto maggiore sarà la sua quantità nell'idrogel.

#### **3.3.4 Studi di degradazione chimica ed enzimatica degli idrogeli**

Poichè gli idrogeli preparati sono stati proposti per la somministrazione per la via orale, allo scopo di valutare la loro stabilità in condizioni gastriche simulate, i campioni sono stati incubati per 2 ore in soluzione HCl 0.1 N (pH 1.0).

I risultati sono riportati in tabella 7, e mostrano che a causa dell'assenza di legami facilmente degradabili idroliticamente, avviene una bassissima degradazione chimica, indipendentemente dalla quantità di PEGBa presente nell'idrogel.



**Tabella 7.** Valori di degradazione % in soluzione di HCl 0.1 N (pH 1.0) e in tampone fosfato pH 4.7 in assenza o in presenza di inulinasi (10 U/ml) per gli idrogeli di INUDV/PEGBa-A, INUDV/PEGBa-B e INUDV/PEGBa-C

| <b>Idrogel</b> | <b>Degradazione % a pH 1.0</b> | <b>Degradazione % a pH 4.7 senza inulinase</b> | <b>Degradazione % a pH 4.7 con inulinase (10 U/ml)</b> |
|----------------|--------------------------------|--|--|
| INUDV/PEGBa-A  | 3.3 ± 0.3                      | 3.1 ± 0.1                                      | 22.4 ± 2.0   |
| INUDV/PEGBa-B  | 2.7 ± 0.2                      | 2.4 ± 0.2                                      | 29.6 ± 1.5   |
| INUDV/PEGBa-C  | 2.5 ± 0.3                      | 2.9 ± 0.1                                      | 36.5 ± 1.8   |

Secondo i dati ottenuti è ragionevole supporre che questi idrogeli potrebbero passare attraverso lo stomaco senza subire un'apprezzabile degradazione. Nel fluido intestinale, essi potrebbero subire una degradazione ad opera degli enzimi intestinali, come l'*inulinasi*. Per questo motivo, questi idrogeli sono stati incubati per 24 ore in presenza di inulinasi in tampone fosfato pH 4.7 (valore di pH ottimale per l'attività delle inulinasi) o in assenza di enzima come controllo negativo. Come riportato in tabella 7, avviene una degradazione trascurabile quando l'inulinasi è assente nel mezzo, invece, in presenza di enzima, tutti gli idrogeli subiscono una degradazione pronunciata che aumenta all'aumentare della quantità di PEGBa presente nell'idrogel, in accordo con l'aumento del grado di *swelling* che potrebbe facilitare la permeazione dell'enzima nel *network* polimerico. Quindi, i dati di degradazione enzimatica confermano che l'inulina, anche se derivatizzata con il divinil sulfone e coreticolata con il PEGBa, può essere degradata dall'inulinasi.

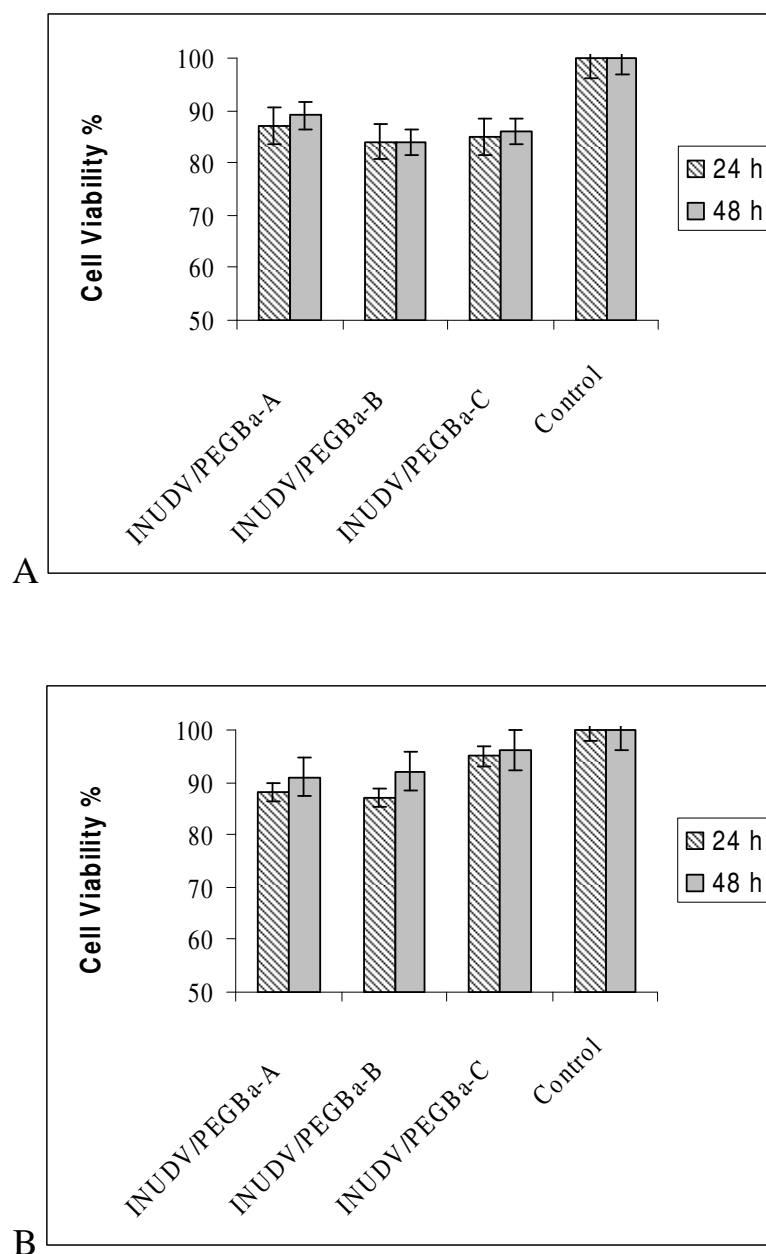
### 3.3.5 Compatibilità cellulare degli idrogeli INUDV/PEGBa

Il test di compatibilità cellulare è un buon primo step per fornire un'evidenza predittiva della biocompatibilità del materiale.

In particolare, attraverso un metodo rapido, standardizzato ed economico, è possibile determinare se un materiale può causare effetti avversi su cellule isolate.

Pertanto, la compatibilità cellulare degli idrogeli di INUDV/PEGBa è stata valutata sulle cellule Caco-2, scelte come modello di cellule intestinali. Questi studi sono stati condotti mediante due differenti metodi: il “*metodo diretto*” ed il “*metodo indiretto*”.

In particolare, nel “*metodo diretto*” gli idrogeli di INUDV/PEGBa sono stati direttamente incubati per 24 e 48 ore con le cellule Caco-2, mentre il “*metodo indiretto*” è stato eseguito per valutare se le cellule sono compatibili, dopo un periodo di incubazione pari a 24 e a 48 ore, con un mezzo di coltura in cui gli idrogeli INUDV/PEGBa sono stati precedentemente incubati per 5 giorni. La vitalità cellulare è stata valutata mediante il test MTS (vedi parte sperimentale) e i risultati sono mostrati in figura 50.



**Figura 50.** Vitalità cellulare % valutata mediante test MTS dopo 24 o 48 ore di incubazione delle cellule Caco-2 con gli idrogeli INUDV/PEGBa: A) metodo diretto ; B) metodo indiretto

E' evidente che tutti gli idrogeli studiati non causano significative variazioni nella vitalità cellulare dopo il loro contatto sia diretto che indiretto con le cellule, cioè, questi materiali sono privi (o non contengono quantità significative) di derivati dannosi biologicamente.

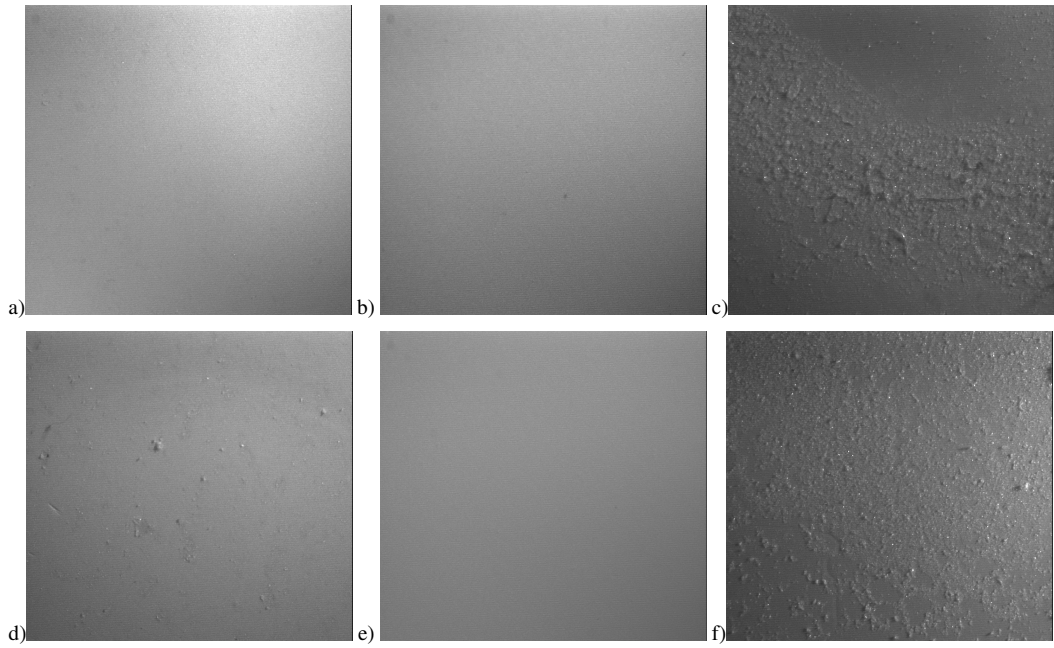
Allo scopo di studiare l'applicabilità del sistema come DDS è stato scelto l'idrogel INUDV/PEGBa-C in quanto, mostrando un maggior grado di rigonfiamento e una più elevata degradabilità ad opera delle inulinasi, rappresenta il campione che potrebbe consentire un ottimale rilascio di principio attivo in esso incorporato.

### **3.3.6 Studi di interazione con la mucina**

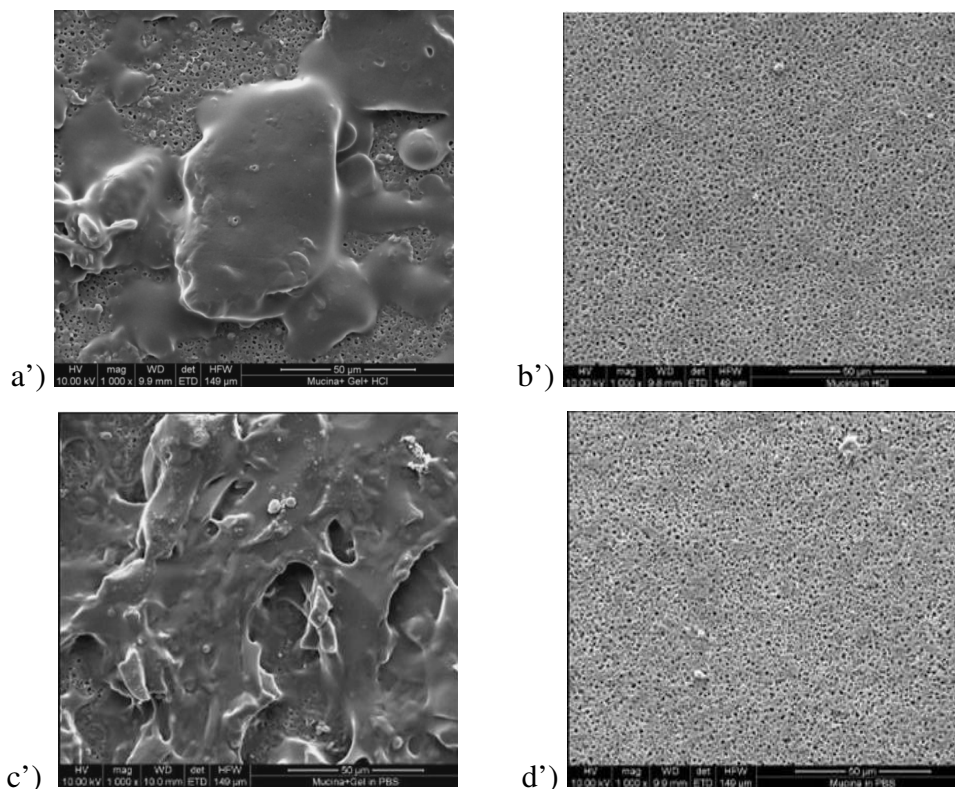
Le proprietà mucoadesive dell'idrogel INUDV/PEGBa-C sono state studiate ricreando *in vitro* le condizioni di contatto che si verificano *in vivo*, consentendo un intimo contatto tra la dispersione di mucina e la dispersione dell'idrogel su un supporto rappresentato da un filtro di acetato di cellulosa. Le dispersioni sono state incubate a 37°C per 2 ore a pH 1.0 (fluido gastrico simulato) e per 24 ore a pH 6.8 (fluido intestinale simulato) [Choy Y.B. *et al.*, 2008].

La quantità di microgel adeso è stata valutata sia mediante analisi qualitativa che quantitativa.

La valutazione qualitativa, effettuata visualizzando l'adesione del microgel sulla dispersione di mucina, è stata condotta mediante analisi al Quantimet (figura 51) e mediante analisi SEM (figura 52) che hanno mostrato una maggiore adesione dell'idrogel alla mucina a pH 6.8 rispetto a pH 1.0.



**Figura 51.** Analisi al *Quantimet*. a) filtro senza mucina + gel in HCl pH 1.0; b) filtro con sola mucina in HCl pH 1.0 “*bianco*”; c) filtro con mucina + gel in HCl pH 1.0; d) filtro senza mucina + gel in PBS pH 6.8; e) filtro con sola mucina in PBS pH 6.8 “*bianco*”; f) filtro con mucina + gel in PBS pH 6.8



**Figura 52.** Analisi SEM. a') filtro con mucina + gel in HCl pH 1.0; b') filtro con sola mucina in HCl pH 1.0 "bianco"; c') filtro con mucina + gel in PBS pH 6.8; d') filtro con sola mucina in PBS pH 6.8 "bianco"

La valutazione quantitativa è stata effettuata determinando la differenza in peso tra il filtro contenente mucina e gel e il filtro contenente la sola mucina, rispetto al peso del gel inizialmente caricato. Si è così calcolato che circa il 50% di gel aderisce alla mucina per valori di pH pari a 1.0, mentre a pH pari a 6.8 la quantità di gel adeso è di circa l' 90% .

Questa differenza potrebbe essere spiegata in base ad una diversa interazione tra i gruppi di acido sialico presenti nelle mucoproteine (mucina) e i gruppi dell'idrogel. I residui -COOH dell'acido sialico a pH acido restano indissociati, mentre a pH 6.8 si dissociano formando interazioni ioni/dipolo con i gruppi -OH e -NH dell'idrogel.

### **3.3.7 Impiego dell'idrogel INUDV/PEGBa-C come *drug delivery system***

Considerate le ottime proprietà dell'idrogel INUDV/PEGBa-C, quali resistenza all'idrolisi chimica, degradabilità in presenza delle inulinasi e mucoadesività soprattutto in ambiente intestinale, tale campione può essere proposto come sistema di veicolazione di farmaci da somministrare per via orale. Il farmaco scelto è stata la flutamide, un farmaco di sintesi utilizzato nel trattamento del carcinoma prostatico che viene comunemente somministrato per via orale sotto forma di compresse [Manfred P. Wirth *et al.*, 2007].

La quantità di flutamide contenuta in ognuna di essa è pari a 250 mg, e poichè l'emivita del farmaco è circa 6-7 ore si rende necessaria una triplice somministrazione giornaliera delle compresse attualmente presenti in commercio.

#### **3.3.7.1 Caricamento del farmaco nell'idrogel**

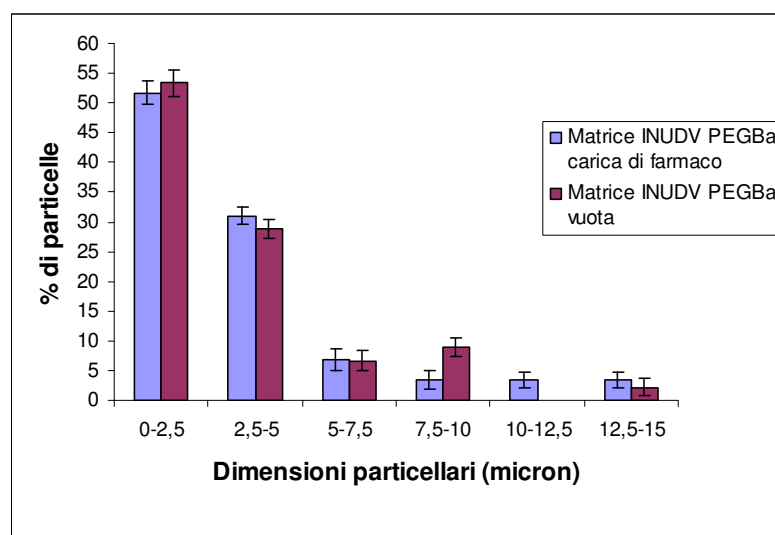
Poichè la flutamide è molto poco solubile in ambiente acquoso il caricamento nella matrice è stato effettuato tramite impregnazione, ossia il caricamento del principio attivo sull'idrogel già formato, mediante diffusione attraverso i pori della matrice [Kim S.W. *et al.*, 1992].

La flutamide è stata quindi solubilizzata in etanolo e questa soluzione è stata messa a contatto con la matrice INUDV/PEGBa-C per tre giorni. L'impregnazione è stata condotta in modo tale da produrre una quantità di flutamide uguale a quella presente nelle compresse, pari ad una *drug loading* del 33% (p/p), per poter paragonare il rilascio del farmaco rispetto alla forma di dosaggio.

### 3.3.7.2 Analisi dimensionale dei microgeli

L'idrogel INUDV/PEGBa-C sia vuoto che pieno, è stato reso in forma microparticellare mediante trattamento con acetone e successivo essiccamento. I microgeli ottenuti sono stati sottoposti a studi di analisi dimensionale.

Dalla figura 53 si nota una distribuzione ristretta delle microparticelle (di forma pressoché sferica), con un diametro equivalente massimo nel range di 0-2,5  $\mu\text{m}$  per il 50-55% di microparticelle sia per la matrice vuota che per quella carica di farmaco. Quindi, la presenza di flutamide non causa significative variazioni nella distribuzione dimensionale delle microparticelle.



**Figura 53.** Distribuzione delle dimensioni delle microparticelle dell'idrogel di INUDV/PEGBa-C con e senza farmaco incorporato

### 3.3.7.3 Analisi ai Raggi X

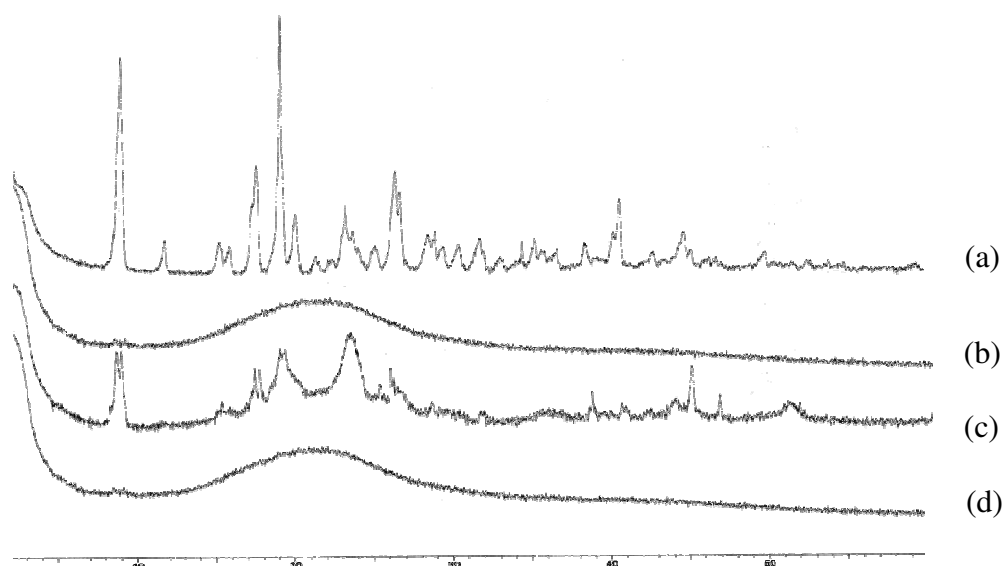
La determinazione dello stato fisico delle microparticelle è stata effettuata tramite analisi di diffrattometria a raggi X.

In figura 54 è mostrato il diffrattogramma dei campioni di flutamide pura, della miscela fisica dell'idrogel INUDV/PEGBa-C con la



flutamide, dell'idrogeli di INUDV/PEGBa-C vuoto e dell'idrogel contenente il farmaco.

In particolare, dallo spettro di diffrazione si evidenzia che mentre la flutamide in forma libera è allo stato cristallino, quando è caricata nel *network* polimerico passa allo stato amorfo. Anche l'idrogel senza farmaco si trova allo stato amorfo. Questo significa che il farmaco incapsulato nella matrice passando dalla forma cristallina a quella amorfa, si troverà in uno stato fisico prontamente disponibile al processo di dissoluzione nel mezzo di rilascio.

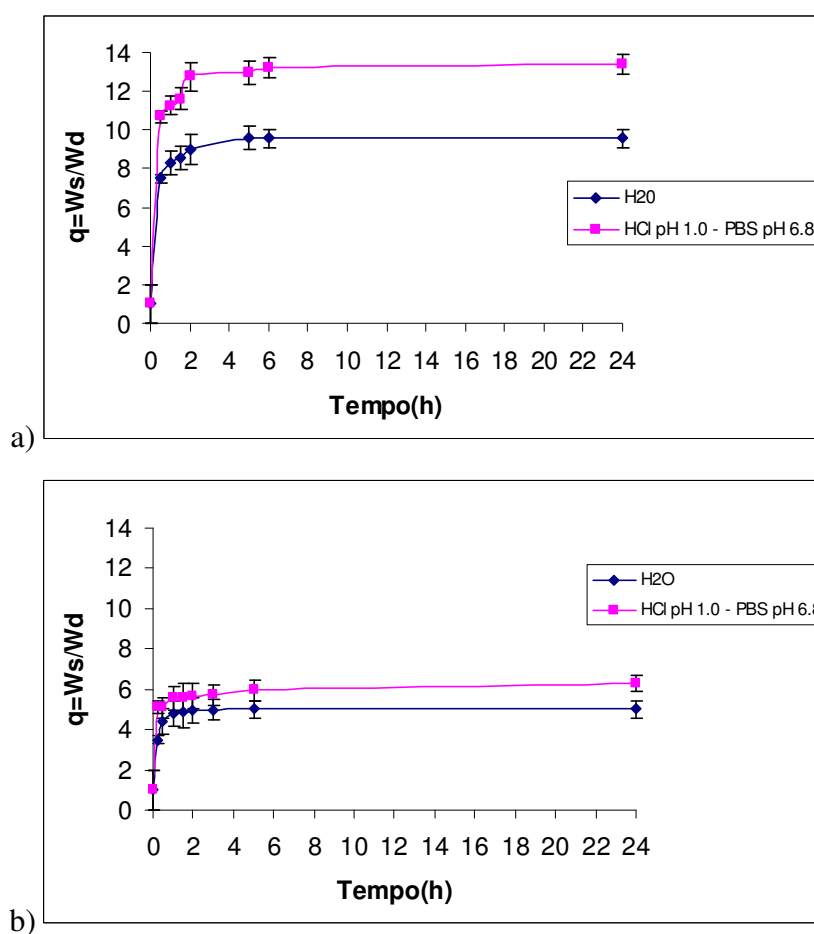


**Figura 54.** Difrattogrammi di flutamide cristallizzata (a); matrice INUDV/PEGBa senza farmaco (b); miscela fisica matrice/flutamide (c); matrice INUDV/PEGBa contenente il farmaco

#### 3.3.7.4 Studi di swelling sull'idrogel contenente flutamide

Sull'idrogel contenente flutamide sono stati condotti studi di rigonfiamento in acqua e in fluido gastrico o intestinale simulato, allo scopo di valutare se il farmaco induce variazioni nell'affinità dell'idrogel verso il mezzo acquoso.

E' stato osservato che la presenza della flutamide determina un decremento nella capacità di rigonfiamento dell'idrogel nei mezzi considerati, rispetto al campione privo di principio attivo, probabilmente per effetto della idrofobicità del farmaco che provoca una riduzione dell'affinità della matrice verso la fase acquosa (figura 55).



**Figura 55.** Studi di *swelling* dinamico dell'idrogel vuoto (a) e Studi di *swelling* dinamico dell'idrogel contenente il farmaco (b) in acqua bidistillata per 24 ore, soluzione di HCl pH 1.0 (simulante il fluido gastrico) e soluzione tampone fosfato pH 6.8 (simulante il fluido intestinale) fino alle 24 ore. L'idrogel si trova in forma microparticellare in seguito a trattamento con acetone e successivo essiccamento sotto vuoto

### **3.3.7.5 Studi di rilascio della flutamide**

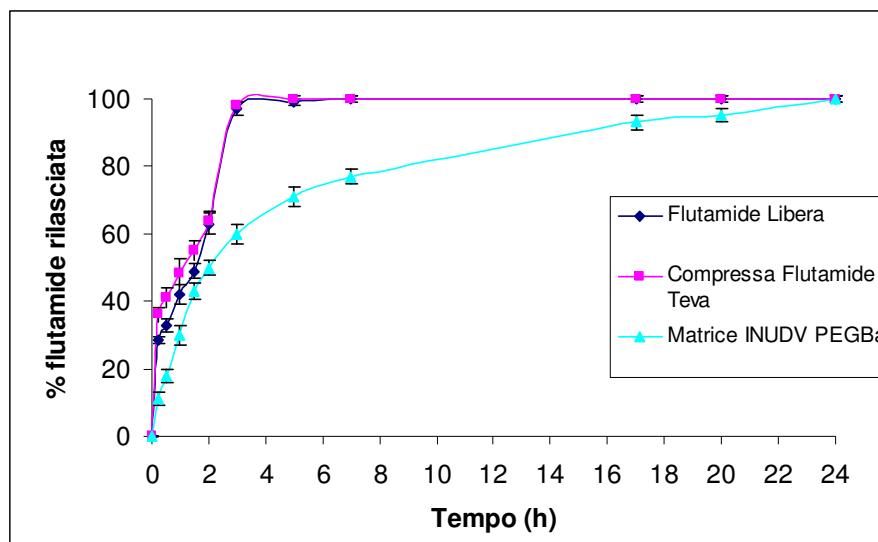
Per evidenziare le potenzialità dell'idrogel INUDV/PEGBa-C nel garantire un rilascio protratto della flutamide, il rilascio del farmaco dalla matrice è stato paragonato alla dissoluzione del farmaco dalla compressa di "Flutamide Teva" presente in commercio e alla dissoluzione della flutamide come farmaco libero.

Gli esperimenti di rilascio *in vitro* sono stati condotti in condizioni sperimentali capaci di simulare l'ambiente gastrointestinale: a 37°C a pH 1.0 (fluido gastrico simulato) e a pH 6.8 (fluido intestinale simulato) utilizzando il metodo del salto di pH come descritto nella parte sperimentale.

A causa della scarsa solubilità della flutamide in ambiente acquoso è stato necessario aggiungere al mezzo di rilascio il Tween 80, un tensioattivo non ionico che viene comunemente impiegato per aumentare la solubilità in acqua di farmaci idrofobici nei saggi di dissoluzione delle forme farmaceutiche [Wuelfing W.P. et al., 2006].

Il Tween 80 è stato aggiunto al mezzo di rilascio in concentrazione pari al 3% (p/v). La quantità di farmaco rilasciata è stata analizzata mediante analisi HPLC [Wuelfing W.P. et al., 2006].

In figura 56 è riportato il grafico di rilascio del farmaco espresso come percentuale di farmaco rilasciato (%) in funzione del tempo.



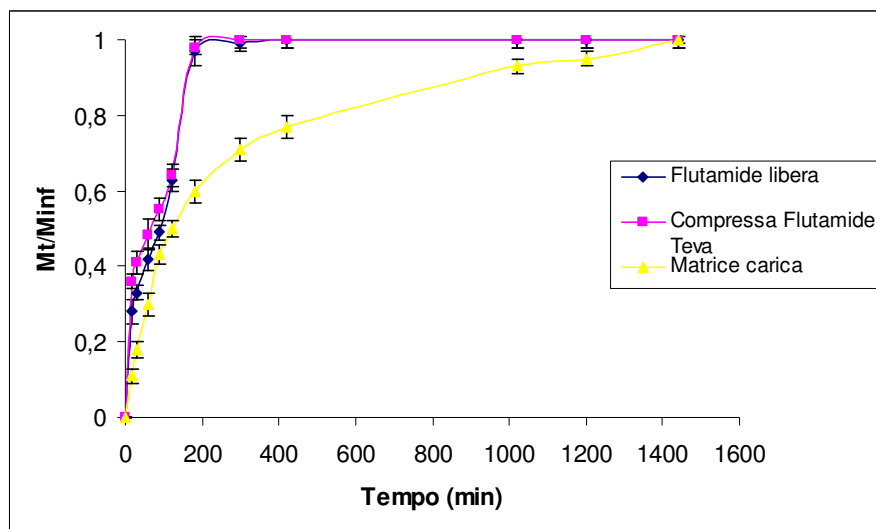
**Figura 56.** Percentuale di flutamide rilasciata dalla matrice INUDV/PEGBa-C, e di flutamide dissolta dalla compressa di Flutamide Teva e dalla forma libera in soluzione di HCl pH 1.0 (simulante il fluido gastrico) per 2 ore e in soluzione tampone fosfato pH 6.8 (simulante il fluido intestinale) fino alle 24 ore

Come mostrato in figura l'andamento di dissoluzione del farmaco libero e del farmaco dalla compressa è simile, raggiungendo il 100% di dissoluzione entro le 3 ore.

Il rilascio del farmaco dalla matrice invece, è più graduale, esso infatti è di circa il  $50 \pm 2\%$  nelle prime 2 ore a pH 1.0, e aumenta a valori di pH 6.8, più gradualmente rispetto alle altre due forme di dosaggio, raggiungendo il valore massimo di rilascio del 100% dopo le 24 ore.

### 3.3.7.6 Analisi del meccanismo di rilascio del farmaco dalla matrice

Per sistemi microparticellari di forma sferica è possibile studiare il tipo di rilascio di farmaco dalla matrice adottando una procedura di *fitting* matematico applicata sui dati di rilascio, riportati come frazione di farmaco rilasciato ( $M_t/M_\infty$ ) in funzione del tempo (espresso in minuti).



**Figura 57.** Frazione di flutamide rilasciata dalla matrice INUDV/PEGBa-C, e di flutamide dissolta dalla compressa di Flutamide Teva e dalla forma libera in soluzione di HCl pH 1.0 (simulante il fluido gastrico) per 2 ore e in soluzione tampone fosfato pH 6.8 (simulante il fluido intestinale) fino alle 24 ore

Il rilascio del principio attivo da un idrogel in funzione del tempo, può essere controllato dalla diffusione attraverso le maglie del *network* (rilascio fickiano), e/o dallo *swelling* della matrice indotto dal mezzo penetrante con conseguente allargamento delle maglie.

Il tipo di cinetica di rilascio può essere analizzata attraverso l'equazione:

$$M_t/M_\infty = Kt^n \quad (1)$$

in cui  $M_t/M_\infty$  è la frazione di farmaco rilasciata al tempo  $t$ , e  $K$  ed  $n$  sono la costante e l'esponente cinetico caratteristici del sistema e del mezzo di dissoluzione. Questa equazione viene applicata per valori  $M_t/M_\infty \leq 0.6$ .

Dal *fitting* matematico dei dati di rilascio si ottiene il valore di  $n$ . Per matrici sferiche, se  $n=0.43$  avremo un rilascio fickiano, cioè governato dalla diffusione, se  $n=0.85$  avremo un rilascio del tipo Caso II (governato dallo *swelling* del sistema), se  $0.43 < n < 0.85$  avremo un

rilascio definito “anomalo”, cioè è possibile che esistano lenti processi di rilassamento delle catene macromolecolari che al pari della diffusione determinano la velocità di rilascio.

Per determinare l’importanza relativa dei due meccanismi di rilascio viene applicata un’altra equazione:

$$M_t/M_\infty = K_1 t^{1/2} + K_2 t \quad (2)$$

in cui si ammette che il rilascio di un soluto può essere descritto considerando un termine diffusionale ( $K_1$ ) ed un termine di rilassamento molecolare ( $K_2$ ). Questa equazione viene applicata per valori di  $M_t/M_\infty \leq 0.95$ . Paragonando le due costanti si può determinare se il meccanismo di rilascio predominante è il rigonfiamento della matrice oppure la diffusione del principio attivo dalla matrice rigonfia.

I dati ottenuti dall’analisi dei valori di rilascio per l’idrogel INUDV/PEGBa-C (figura 57) sono riportati in tabella 8.

**Tabella 8.** *Fitting* dei dati di rilascio ottenuti con le equazioni (1) e (2).

| $M_t/M_\infty = Kt^n$ (1)                | $K$ (min <sup>-n</sup> )     | $n$                              | $R^2$ |
|--|------------------------------|----------------------------------|-------|
|  | $0.02173 \pm 0.004$          | $0.64655 \pm 0.042$              | 0.989 |
| $M_t/M_\infty = K_1 t^{1/2} + K_2 t$ (2) | $K_1$ (min <sup>-1/2</sup> ) | $K_2$ (min <sup>-1</sup> )       | $R^2$ |
|  | $0.05062 \pm 0.002$          | $-6.63558e^{-4} \pm 1.678e^{-4}$ | 0.981 |

Dai valori ottenuti, si evince che per  $n=0.64$  il rilascio di flutamide dalla matrice INUDV/PEGBa-C è di tipo anomalo, e poichè nell’equazione (2) si ottiene che il contributo diffusionale ( $K_1$ ) è maggiore rispetto al contributo di rilassamento ( $K_2$ ), si deduce che il meccanismo di rilascio è principalmente Fickiano.

Infine, per calcolare il coefficiente di diffusione apparente,  $D_i$ , la porzione finale del profilo di rilascio ( $0.6 \leq M_t/M_{inf} \leq 1$ ) è stata analizzata mediante l'equazione riportata di seguito applicata per matrici sferiche:

$$1 - M_t/M_{inf} = (6/\pi^2) \exp [-(\pi^2 D_i t / r^2)]$$

dove  $r$  è il raggio delle microparticelle swellate.

Poiché per valori di  $0.6 \leq M_t/M_{inf} \leq 1$  ci troviamo a valori di pH 6.8, il valore medio di  $r$  per le microparticelle swellate dell'idrogel INUDV-PEGBa-C, a pH 6.8, è pari a 3.5  $\mu\text{m}$ , determinato osservando la variazione del diametro delle microparticelle durante il periodo di rilascio, mediante uno stereomicroscopio connesso ad un analizzatore di immagine.

Il coefficiente di diffusione,  $D_i$ , è pertanto risultato pari a  $6.32 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{sec}$ .

### 3.3.8 Conclusioni

In questo lavoro sono stati ottenuti nuovi idrogeli mediante *crosslinking* chimico tra un derivato divinil sulfonico dell'inulina (INUDV) e il O,O'-Bis(2-aminoetil)polietileneglicole (PEGBa).

La reazione di *crosslinking* è stata condotta in tampone fosfato a pH 7.4, in assenza di iniziatori chimici, a temperatura ambiente per sole 4 ore e variando la quantità di PEGBa.

Gli idrogeli di INUDV/PEGBa, ottenuti con resa elevata, sono trasparenti, incolori, inodori, e resistenti all'idrolisi chimica, ma vengono degradati dall'inulinasi.

Essi mostrano una buona affinità verso la fase acquosa ed un'elevata compatibilità cellulare come dimostrata dai test *in vitro* sulle cellule Caco-2.

L'idrogel contenente la maggiore quantità di PEGBa, è stato proposto come sistema di veicolazione di farmaci per la somministrazione per via orale allo scopo di consentirne un rilascio prolungato rispetto alla forma di dosaggio che si usa nella terapia convenzionale.

Il farmaco scelto è stato la flutamide ed è stata studiata la capacità del sistema di rilasciare il farmaco *in vitro* in condizioni gastrointestinali simulate. È stato trovato che la matrice è in grado di rilasciare il farmaco in maniera graduale e prolungata entro 24 ore, a differenza della compressa presente in commercio che rilascia il farmaco entro le 3 ore.

L'analisi dei dati di rilascio mediante *fitting* matematico ha evidenziato un rilascio di tipo anomalo con un maggiore contributo fickiano.

Sono in corso studi di biodisponibilità *in vivo* sui cani, allo scopo di valutare la concentrazione ematica raggiunta dalla flutamide rilasciata



dalla forma farmaceutica in commercio (compressa di “Flutamide Teva”) rispetto alla concentrazione raggiunta dallo stesso farmaco rilasciato dalla matrice di INUDV/PEGBa.

## 4. PARTE SPERIMENTALE

### 4.1 SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DI COPOLIMERI FLUORURATI A BASE DI PHEA PER LA VEICOLAZIONE DI FARMACI LIPOFILI

#### 4.1.1 Materiali

Acido D,L-Aspartico, etanolammina, trietilammina (TEA), etilendiammina (EDA), O-(2-amminoetil)-O'-metil polietilene glicole Mw 2000 Da (PEG<sub>2000</sub>-NH<sub>2</sub>), etere dietilico, acetone, 2-propanolo, etanolo, butanolo sono stati acquistati alla Fluka (Italia). *N,N*-dimetilformamide anidra 99.9% (DMF-*a*), bis(4-nitrofenil)carbonato (PNFC), D<sub>2</sub>O (purezza isotopica 99.9%), acetato di etile, diclorometano, flutamide, diidrotestosterone (DHT), LNCaP cell (*lymphnode metastatic lesion of human prostatic adenocarcinoma*), sodio piruvato, siero bovino fetale “*charcoal stripped*” (ZSD), pirene, siero bovino fetale (FBS) sono stati acquistati alla Sigma-Aldrich (Italia).

Glutammina, penicillina, streptomina, RPMI 1640 sono stati acquistati alla Celbio. MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carbossimetossifenil)-2-(4-sulfofenil)2H-tetrazolio] è stato acquistato alla Promega.

Il plasma umano è stato ottenuto da donatori volontari di sangue in buono stato di salute.

Il 5-pentafluorofenil-3-perfluoroetil-1,2,4 ossadiazolo (PPOX) [Buscemi S. et al., 2006 (B)] e il 3-carbossietil-5-perfluoroetil-1,2,4 ossadiazolo (CPOX) sono stati preparati secondo una procedura già descritta in letteratura [Buscemi S. et al., 2006 (A)].

#### 4.1.2 Apparecchiature

Gli spettri FT-IR sono stati eseguiti in *pellets* di KBr nel *range* 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ , usando uno spettrometro FT-IR Perkin Elmer 1720 a trasformata di Fourier, con una risoluzione di 1  $\text{cm}^{-1}$  e un numero di scansioni pari a 100.

Gli spettri UV-VIS sono stati registrati in EtOH mediante uno Spettrofotometro Jasco 7800 UV/VIS. Gli spettri  $^1\text{H}$ -NMR e  $^{19}\text{F}$  NMR sono stati registrati mediante uno strumento Bruker Avance 300 MHz operante rispettivamente a 300 e a 282.3 MHz. Gli spettri  $^1\text{H}$ -NMR sono stati registrati usando TMS come standard interno. Gli spettri  $^{19}\text{F}$  NMR sono stati registrati utilizzando il  $\text{C}_6\text{F}_6$  come standard esterno.

Le centrifugazioni sono state effettuate utilizzando una centrifuga International Equipment Company Centra MP4R, dotata di un rotore 854 e di un dispositivo di controllo della temperatura.

I pesi molecolari sono stati determinati mediante un sistema di cromatografia ad esclusione di peso molecolare (SEC), equipaggiato con una pompa, due colonne di Phenogel (Phenomenex, dimensione particellare 5  $\mu\text{m}$ ,  $10^3$  Å e  $10^4$  Å come dimensione dei pori) e un rifrattometro differenziale 410 (DRI) come rivelatore, acquistati alla Waters (Mildford, MA, USA). I pesi molecolari sono stati determinati usando standard di POE/PEG (range 232-932000 Da), fase mobile di DMF/0,01M LiCl, temperatura di 50°C, flusso di 0.8 ml/min, concentrazione di polimeri di 3 mg/ml. L'analisi SEC è stata anche condotta utilizzando due colonne Tosoh (dimensione particellare 10 mm e 6 mm), fase mobile di tampone TRIS 0.1 M pH 8.0/NaCl 0.2 M, temperatura di 37°C, flusso di 0.8 ml/min, concentrazione di polimeri pari a 3 mg/ml.

Il contenuto di flutamide negli aggregati polimerici è stato determinato mediante analisi HPLC, utilizzando uno strumento Agilent 1100 Series equipaggiato con una colonna Waters C<sub>18</sub>, fase mobile di metanolo/PBS pH 4 (50:50), flusso di 1 ml/min, lunghezza d'onda di assorbimento di 302 nm. Il contenuto di flutamide presente all'interno degli aggregati polimerici è stato valutato utilizzando una curva di taratura determinata nel range di concentrazione 1.75–9 mg/l in acqua bidistillata ( $y=33,351x-8,7348$ ; con  $R^2 = 0.9953$ ).

La valutazione della proliferazione cellulare in seguito al test MTS è stata effettuata mediante un lettore Microplate Wallac Victor 2 1420 MULTILABEL COUNTER (Perkin Elmer).

#### 4.1.3 Sintesi del PHEA

L' $\alpha,\beta$ -poli-(N-2-idrossietil)-D,L-aspartammide (PHEA) è stata preparata mediante una reazione tra una polisuccinimide (PSI), ottenuta da una policondensazione termica dell'acido D,L-aspartico ed etanolamina in soluzione di DMF, purificata e caratterizzata secondo una procedura già descritta in letteratura [Giammona G. *et al.*, 1987]. Il lotto di PHEA utilizzato nel presente studio ha un peso molecolare medio pari a 40.500 ( $M_w/M_n = 2.1$ ).

#### 4.1.4 Sintesi e caratterizzazione del PHEA-PEG<sub>2000</sub>

Il PHEA-PEG<sub>2000</sub> è stato preparato, purificato e caratterizzato secondo una procedura già descritta in letteratura [Craparo E.F. *et al.*, 2006]. Il prodotto è stato ottenuto con una resa pari al 95% p/p, rispetto al PHEA di partenza, e ha mostrato un grado di derivatizzazione (DD) in PEG<sub>2000</sub>-NH<sub>2</sub>, determinato mediante <sup>1</sup>H-NMR in D<sub>2</sub>O, pari al  $4.0 \pm 0.5\%$  in moli rispetto alle moli di unità ripetitive di PHEA. Il

peso molecolare medio del PHEA-PEG<sub>2000</sub>, determinato mediante analisi SEC, è risultato pari a 62.3 kDa ( $M_w/M_n = 1.9$ ).

#### 4.1.5 Sintesi e caratterizzazione del PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA

Una soluzione di PHEA-PEG<sub>2000</sub> 83.3 mg/ml di DMF-*a* ( $DD_{PEG_{2000}-NH_2} = 4.0 \pm 0.5\%$  in moli rispetto alle moli di unità ripetitive di PHEA) è stata aggiunta goccia a goccia ad una soluzione di PNFC in DMF-*a* (4 ml) sotto costante agitazione. La miscela ottenuta è stata posta ad agitare sotto argon a 40°C per un tempo di attivazione pari a 4 ore. Dopo tale tempo, la miscela di reazione è stata aggiunta goccia a goccia ad una opportuna quantità di EDA e lasciata a 25°C per 2 ore sotto argon e sotto continua agitazione, secondo i rapporti:

$$X' = \frac{\text{moli di PNFC}}{\text{moli gruppi } -OH \text{ del PHEA-PEG}_{2000}} = 1$$

$$Y' = \frac{\text{moli di EDA}}{\text{moli gruppi } -OH \text{ del PHEA-PEG}_{2000}} = 5$$

Al termine della reazione, la soluzione è stata precipitata in 150 ml di etile acetato, il prodotto ottenuto è stato lavato con acetone (8 x 40 ml) ed essiccato sotto vuoto. Il prodotto è stato solubilizzato in acqua bidistillata, sottoposto a dialisi esaustiva mediante un tubo da dialisi Visking (18/32") con *cut-off* di 12 000-14 000, liofilizzato ed ottenuto con una resa pari al 90% p/p rispetto al PHEA-PEG<sub>2000</sub>.

Il grado di derivatizzazione (DD) in EDA è stato determinato mediante <sup>1</sup>H-NMR in D<sub>2</sub>O e calcolato paragonando l'integrale del

picco relativo ai protoni a 2.940  $\delta$  attribuiti ai  $-(\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2)$ , (appartenenti all'EDA) con l'integrale del picco relativo ai protoni a 2.736  $\delta$  attribuibili ai  $-(\text{CO}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH})-$  (appartenenti al PHEA), ed è risultato pari al  $42 \pm 2\%$  in moli rispetto alle moli di unità ripetitive di PHEA. Il peso molecolare medio del PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA è stato determinato mediante analisi SEC in DMF ed è risultato pari a 57 kDa.

#### 4.1.6 Sintesi e caratterizzazione del PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX

100 mg di PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA sono stati solubilizzati in 3 ml di DMF-*a*, quindi sono state aggiunte quantità opportune di PPOX e di TEA usato come catalizzatore, secondo i rapporti:

$$X'' = \frac{\text{moli di PPOX}}{\text{moli gruppi } -\text{NH}_2 \text{ del PHEA-PEG}_{2000}\text{-EDA}} = 0.6; 1.2; 2$$

$$Y'' = \frac{\text{moli di TEA}}{\text{moli gruppi } -\text{NH}_2 \text{ del PHEA-PEG}_{2000}\text{-EDA}} = 0.6; 0.6; 1$$

Le miscele sono state poste a 25 °C sotto argon e sotto costante agitazione per 24 ore. Al termine della reazione, si è proceduto con la purificazione dei prodotti ottenuti.

In particolare, per la sintesi con  $X''=0.6$  e  $Y''=0.6$  la soluzione è stata precipitata in 100 ml di isopropanolo, il prodotto è stato isolato, lavato con isopropanolo (4 x 50 ml) ed essiccato sotto vuoto.

Per le altre sintesi, ogni miscela di reazione è stata precipitata in 100 ml di dietil etere, ogni prodotto è stato isolato, lavato con dietil etere (5 x 50 ml) ed essiccato sotto vuoto.

I copolimeri ottenuti, denominati PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>1</sub> (per X''=0.6; Y''=0.6), PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>2</sub> (per X''=1.2; Y''=0.6) e PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>3</sub> (per X''=2; Y''=1), sono stati solubilizzati in acqua bidistillata e sottoposti a dialisi esaustiva usando un tubo da dialisi Visking (18/32'') con *cut-off* di 12 000-14 000 e poi liofilizzati. I prodotti sono stati ottenuti con una resa pari rispettivamente a 65%, 82% e 98% p/p, rispetto al PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA. I campioni ottenuti sono stati caratterizzati mediante FT-IR, <sup>19</sup>F-NMR e analisi SEC.

#### 4.1.7 Sintesi e caratterizzazione del PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX

100 mg di PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA sono stati solubilizzati in 3 ml di DMF-*a* ed è stata aggiunta la quantità opportuna di CPOX secondo il rapporto:

$$X''' = \frac{\text{moli di CPOX}}{\text{moli gruppi } -\text{NH}_2 \text{ del PHEA-PEG}_{2000}\text{-EDA}} = 0.6; 1.2; 2$$

Le miscele sono state poste a 25°C sotto argon e sotto costante agitazione per 24 ore. Al termine della reazione ogni miscela di reazione è stata precipitata in 100 ml di dietil etere, ogni prodotto è stato isolato, lavato con dietil etere (5 x 50 ml) ed essiccato sotto vuoto. I copolimeri ottenuti, PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>1</sub> (X'''=0.6), PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>2</sub> (X'''=1.2) e PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>3</sub> (X'''=2), sono stati solubilizzati in acqua bidistillata, sottoposti

a dialisi esaustiva usando un tubo da dialisi Visking (18/32”) con *cut-off* di 12 000-14 000 e liofilizzati.

I prodotti sono stati ottenuti rispettivamente con una resa in peso pari a 90%, 85% e 92%, rispetto al PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA. Tutti i campioni ottenuti sono stati caratterizzati mediante FT-IR, <sup>19</sup>F-NMR e analisi SEC.

#### **4.1.8 Determinazione UV del contenuto in ossadiazolo fluorurato nei copolimeri PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>1-3</sub> e PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>1-3</sub>**

La quantità di ossadiazolo PPOX e CPOX legato al copolimero PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA è stata determinata mediante spettroscopia UV, paragonando l'assorbanza a 325 nm di ogni copolimero di PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX e a 250 nm di ogni copolimero di PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX in una soluzione H<sub>2</sub>O/EtOH (20% v/v) mediante una curva di taratura ottenuta con due composti modello: il 2,3,5,6-tetrafluoro-4-etilammino-fenil)-3-perfluoroetil-1,2,4-ossadiazolo (PPOX') per la serie PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>1-3</sub> e il 5-perfluoroetil-3-N-etilcarbrossiammido-1,2,4-ossadiazolo (CPOX') per la serie PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>1-3</sub>. I due prodotti PPOX' e CPOX' sono stati ottenuti mediante una procedura altrove riportata [Buscemi S. et al., 2006 (A); Buscemi S. et al., 2006 (B)].

#### **4.1.9 Determinazione della concentrazione di aggregazione critica**

La concentrazione di aggregazione critica (CAC) dei copolimeri PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>3</sub> e PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>3</sub> è stata determinata mediante spettroscopia a fluorescenza impiegando il pirene. Il pirene è stato solubilizzato in acetone e diluito con PBS



pH 7.4 sino ad una concentrazione di  $12 \times 10^{-7}$  M. L'acetone residuo è stato totalmente evaporato sotto vuoto. I due copolimeri sono stati a loro volta solubilizzati in PBS pH 7.4 a concentrazioni comprese tra  $1 \times 10^{-5}$  e 2.5 mg/ml per il copolimero PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>3</sub>, e tra  $1 \times 10^{-3}$  e 15 mg/ml per il copolimero PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>3</sub>. Sono stati quindi miscelati identici volumi di pirene e delle soluzioni dei due copolimeri, e le miscele ottenute sono state lasciate per una notte a riposo, prima dell'analisi. Per determinare la formazione di microdomini idrofobici derivanti dall'associazione dei copolimeri, si è monitorata la variazione del rapporto delle intensità dello spettro di eccitazione del pirene a 333 nm (pirene in acqua,  $I_{333}$ ) e a 336 nm (pirene nel mezzo idrofobico,  $I_{336}$ ). Diagrammando il rapporto  $I_{336}/I_{333}$  contro il logaritmo della concentrazione del copolimero in fase acquosa, si ottiene una curva sigmoideale da cui è possibile valutare la CAC.

I valori della CAC sono stati inoltre determinati valutando le dimensioni degli aggregati dei campioni PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>3</sub> e PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>3</sub> in funzione della concentrazione in mezzo acquoso (range 0.01-1 mg/ml) a 25 °C, utilizzando uno strumento Zeta Sizer Nano ZS (Malvern Instruments, Herrenberg, Germany).

#### 4.1.10 Microscopia elettronica a scansione (SEM)

La morfologia e la dimensione degli aggregati sono state visualizzate mediante microscopia elettronica a scansione (SEM). I campioni sono stati preparati ponendo dispersioni acquose di aggregati PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>3</sub> e PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>3</sub> (0.5 mg/ml) in uno *stub* di carbonio, e sono stati essiccati a

temperatura ambiente per tutta la notte prima dell'analisi al microscopio elettronico. Le immagini SEM sono state ottenute utilizzando un microscopio elettronico a scansione Philips XL 20 ESEM.

#### **4.1.11 Preparazione delle micelle cariche di flutamide**

Micelle cariche di flutamide sono state preparate a temperatura ambiente, mediante un'intima miscelazione (in mortaio) dei copolimeri e del farmaco in forma solida. Sono state miscelate quantità note di Flutamide (50 mg) e dei copolimeri PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>3</sub> e PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>3</sub> (50 mg). Aliquote di 500 µl di acqua bidistillata sono state aggiunte ad ogni miscela sotto continua agitazione fino a 5 ml di volume. La sospensione ottenuta è stata sonicata per 10 minuti, poi centrifugata a 8500 rpm per 7 min a 25°C, filtrata su filtri di acetato di cellulosa 0.45 µm (Whatman) e liofilizzata per 5 giorni.

#### **4.1.12 Studi di solubilità della flutamide**

La solubilità della flutamide in acqua è stata determinata mediante dispersione e successiva agitazione di un eccesso di farmaco in acqua bidistillata a 25°C. La sospensione è stata sonicata per 10 minuti, centrifugata a 8500 rpm per 7 minuti e filtrata con filtro in acetato di cellulosa 0.45 µm. La quantità di flutamide nella soluzione satura è stata valutata mediante analisi HPLC.

La solubilità della flutamide è stata anche determinata in presenza dei copolimeri PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>3</sub> e PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>3</sub>: 50 mg di farmaco sono stati miscelati a 50 mg di polimero con aggiunta di 5 ml di acqua. La sospensione ottenuta è stata sonicata

per 10 minuti, centrifugata a 8500 rpm per 7 minuti, filtrata con filtro in acetato di cellulosa da 0.45  $\mu\text{m}$  e analizzata mediante HPLC.

#### 4.1.13 Determinazione del contenuto di farmaco

5 mg di micelle di PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>3</sub> e di PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>3</sub> liofilizzate contenenti il farmaco, sono state solubilizzate in 5 ml di acqua bidistillata e lasciate ad agitare per 24 ore a temperatura ambiente. Dopo tale tempo, le soluzioni acquose sono state analizzate mediante analisi HPLC per determinare il contenuto di flutamide negli aggregati. È stata usata come fase stazionaria una colonna reversed-phase C<sub>18</sub> column (Waters C<sub>18</sub>) e come fase mobile una miscela CH<sub>3</sub>OH/0.05 M PBS (pH = 4), (50:50 v/v) al flusso di 1 ml/min. L'eluato è stato monitorato alla lunghezza d'onda di 302 nm. La quantità di Flutamide caricata negli aggregati è stata calcolata in ognuno di essi usando una curva di calibrazione del farmaco ( $y = 32,946 x - 3,6387$ ) effettuata in acqua ed è stata espressa come *Drug Loading* (%) delle micelle calcolata come:

$$\text{Drug Loading \%} = \frac{\text{peso del farmaco}}{\text{peso totale (micelle + farmaco)} \times 100}$$

#### 4.1.14 Studi di stabilità *in vitro*

La stabilità dei sistemi micellari è stata valutata mediante il metodo della dialisi in PBS pH 7.4 e in plasma umano.

5 mg di micelle polimeriche (PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>3</sub> e PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>3</sub>) sono state solubilizzate in 1 ml di soluzione di tampone fosfato (PBS) a pH 7.4, queste soluzioni sono

state trasferite in una membrana da dialisi (cut off 12 000-14 000) e dializzate contro 9 ml di soluzione di tampone fosfato (PBS) a pH 7.4 o contro 9 ml di plasma umano pretrattato. Entrambe le dispersioni micellari sono state mantenute a  $37 \pm 0.1$  °C in un incubatore per 24 ore a 100 rpm.

Le concentrazioni dei copolimeri usate negli esperimenti sono maggiori della rispettiva CAC e sono state mantenute le condizioni *sink* per tutta la durata dell'esperimento.

A determinati intervalli di tempo, 500 µl del mezzo esterno di dialisi (pH 7.4) sono stati rimossi, filtrati su filtri di acetato di cellulosa 0.45 µm e analizzati mediante HPLC, ed un uguale volume di mezzo fresco è stato aggiunto al mezzo di dialisi.

Per gli studi condotti in plasma umano, 500 µl del mezzo esterno di dialisi sono stati rimossi e per deproteinizzare il plasma, 2 ml di metanolo sono stati aggiunti a 1 ml di surnatante e la sospensione ottenuta è stata centrifugata a 4500 rpm per 15 min. I campioni sono stati filtrati su filtri di acetato di cellulosa 0.45 µm e analizzati mediante HPLC. Un uguale volume di plasma umano è stato aggiunto al mezzo di dialisi.

Ogni esperimento è stato condotto in triplicato.

L'assenza di un forte legame tra il farmaco e le proteine plasmatiche è stata valutata incubando quantità esattamente pesate di flutamide con plasma umano pretrattato, e i campioni sono stati trattati come descritto precedentemente. La quantità di farmaco è stata valutata mediante analisi HPLC del surnatante ed è risultato pari a 94% di farmaco rispetto alla quantità inizialmente pesata.

Il rilascio di flutamide sia in PBS pH 7.4 che in plasma è stato quantificato mediante analisi HPLC usando una curva di calibrazione

costruita con soluzioni standard di flutamide a concentrazioni note sia in acqua bidistillata che in metanolo.

#### **4.1.15 Coltura cellulare**

Cellule LNCaP sono state poste in RPMI 1640 contenente 5% (v/v) di siero bovino fetale (FBS), 1mM sodio piruvato, 1mM glutammina e 1% antibiotici (50mg/ml penicillina e 50 mg/ml streptomicina), in condizioni standard (95% di umidità relativa, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C). Per gli esperimenti di responsività all'ormone, al posto del siero bovino fetale (FBS) è stato utilizzato il siero bovino fetale (ZSD) in cui la concentrazione di ormoni steroidei è ridotta tramite filtrazione su carbonio attivo di circa 20 volte rispetto al siero FBS.

Le cellule LNCaP (negli esperimenti di co-incubazione con gli ormoni steroidei) sono state poste con una densità di  $1 \times 10^5$  cell/ml in RPMI-1640 con 5% (v/v) ZDS su una piastra da 96 pozzetti e successivamente incubate per 96 ore. Dopo questo tempo, il mezzo è stato sostituito con RPMI-1640 fresco contenente il 5% (v/v) ZDS e la proliferazione delle cellule è stata valutata mediante loro co-incubazione con il DHT, con la flutamide libera, con la flutamide micellizzata sia nel sistema polimerico PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-PPOX<sub>3</sub> che nel sistema polimerico PHEA-PEG<sub>2000</sub>-EDA-CPOX<sub>3</sub>, in diversi pozzetti e per un tempo pari a 96 ore.

La flutamide sia libera che micellizzata è stata solubilizzata in PBS pH 7.4, mentre il DHT è stato solubilizzato in DMSO.

Come controllo sono state usate le cellule trattate o non con il DMSO.

#### **4.1.16 Determinazione della proliferazione cellulare**

La proliferazione delle cellule LNCaP è stata valutata mediante il test MTS. Dopo ogni trattamento delle cellule con i diversi campioni, sono stati aggiunti 20 µl di reagente MTS per ogni pozzetto. Dopo 4 ore di incubazione a 37°C , è stata registrata l'assorbanza a 490 nm.

I risultati sono stati espressi come riduzione percentuale dei valori di assorbanza delle cellule rispetto all'assorbanza delle cellule controllo.

#### **4.1.17 Analisi statistica**

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato e i risultati sono stati riportati come media  $\pm$  deviazione standard.

Negli esperimenti di proliferazione cellulare, il valore medio dei dati misurati nel gruppo di controllo è stato posto a 100% e tutti gli altri valori sono stati espressi in relazione a quel valore medio.

## 4.2 SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DI IDROGELI pH-SENSIBILI A BASE DI INULINA

### 4.2.1 Materiali

Anidride succinica 99% (SA), anidride metacrilica 92% (MA), inulina da *Dahlia Tubers*  $M_w \approx 5000$  Da, etere dietilico, inulinasi da *Aspergillus niger* (INUase), e trietilammina (TEA) sono stati acquistati alla Fluka (Italia). N,N-dimetilformamide anidra 99.9% (DMF), D<sub>2</sub>O (purezza isotopica 99.9%), D-(-)Fruttosio (Fru), IgG da siero umano 95%, acido solforico 95-98%, resina a scambio cationico Dowex 50Wx8 200 *mesh*, etanolo 99.9% HPLC grade, poli(etilene glicole)dimetacrilato  $PM \approx 550$  (PEGDM), antrone al 97% e acetone sono stati acquistati alla Aldrich Chemical Co.(Italia). L'ELISA Quantitation Kit Bethyl per le IgG umane è stato acquistato alla Prodotti Gianni (Italia). Gli standard di Pullulano per la GPC sono stati acquistati alla Polymer Laboratories (Germania).

### 4.2.2 Apparecchiature

Le analisi SE-HPLC (*Size exclusion high-pressure liquid chromatography*) sono state eseguite mediante un cromatografo Agilent 1100 equipaggiato con un iniettore Rheodyne 7125 (*loop* di 20  $\mu$ l) e un detector Agilent 1100 HPLC. Le colonne utilizzate sono state: Ultrahydrogel 1000 (*range* di esclusione dimensionale 10000-500000 g/mol) e una Ultrahydrogel 250 (*range* di esclusione dimensionale 1000-50000 g/mol) entrambe acquistate dalla Waters, fase mobile 95% v/v tampone fosfato  $50 \times 10^{-3}$  M/ NaCl  $350 \times 10^{-3}$  M (PBS) pH 6.8, 5% di etanolo HPLC grade, a temperatura ambiente, flusso 0,8 ml/min,  $\lambda = 280$  nm.

Gli spettri  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ ) sono stati ottenuti con un Bruker Avance 300 MHz .

Gli spettri FT-IR sono stati registrati come pastiglie in KBr nel *range* 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  usando un Perkin-Elmer 1720 Fourier Transform Spectrophotometer con una risoluzione di 1  $\text{cm}^{-1}$ ; ogni spettro è stato registrato dopo 100 scansioni.

Le centrifugazioni sono state eseguite con una Beckman Coulter Allegra X-22R, equipaggiata con un rotore ad angolo fisso F0850 e un sistema di refrigerazione.

Gli studi UV sono stati eseguiti usando uno spettrofotometro Shimadzu UV-2401.

Gli studi di degradazione sono stati eseguiti in un Benchtop 80°C Incubator Orbital Shaker model 420. I test ELISA sono stati eseguiti usando un Human IgG ELISA Quantitation Kit by Bethyl e l'ELISA Starter Accessory Kit (E 101) by Bethyl seguendo le procedure indicate dal produttore.

Il Fotometro Thermo Labsystems Multiskan Ex 96- well microplate è stato usato per valutare la vitalità cellulare dopo test MTS e per la lettura della piastra ELISA.

L'irradiazione UV è stata eseguita usando un reattore Rayonet equipaggiato con un Rayonet Carousel motor assembly e 16 lampade al mercurio di 8 W a pressione media con una emissione a 366 nm.

#### **4.2.3 Derivatizzazione dell'inulina con anidride metacrilica e anidride succinica (INUMASA)**

Il derivato INUMASA è stato ottenuto modificando una procedura già riportata in letteratura [Tripodo G. *et al.*, 2005]:



1 g di inulina è stata solubilizzata in 14 ml di DMF anidra per almeno 3 ore. Dopo completa solubilizzazione, sono state aggiunte opportune quantità di trietilammina (TEA) usata come catalizzatore e anidride metacrilica (MA) in accordo con i rapporti:

$$X = \frac{\text{moli di MA}}{\text{moli di unità ripetitive di inulina}} = 0.37$$

$$Y = \frac{\text{moli di TEA}}{\text{moli di unità ripetitive di inulina}} = 0.25$$

La miscela di reazione è stata posta sotto agitazione a 25°C sotto argon per 24 ore. Dopo questo tempo opportune quantità di TEA e anidride succinica sono state aggiunte in accordo con i rapporti:

$$X^1 = \frac{\text{moli di SA}}{\text{moli di unità ripetitive di inulina}} = 0.13$$

$$Y^1 = \frac{\text{moli di TEA}}{\text{moli di unità ripetitive di inulina}} = 0.25$$

La miscela di reazione è stata posta sotto agitazione a 25 °C sotto argon per altre 24 ore. Dopo questo tempo il prodotto di reazione è stato precipitato in 140 ml di una miscela etere/acetone 2:1 e centrifugato a 4°C per 15 minuti a 10 000 rpm. Il prodotto è stato recuperato, lavato diverse volte con la stessa miscela di solventi ed essiccato sotto vuoto. Un grammo del prodotto ottenuto, solubilizzato

in 60 ml di acqua bidistillata, è stato passato attraverso una resina a scambio cationico Dowex 50W x 8 e la soluzione risultante è stata liofilizzata. Il prodotto finale è stato ottenuto con una resa del 99% (p/p) rispetto all'inulina iniziale. Il copolimero INUMASA è stato caratterizzato mediante analisi FT-IR, <sup>1</sup>HNMR e SEC. L'<sup>1</sup>HNMR ha permesso di calcolare il grado di derivatizzazione molare (DD) dei residui di MA e SA legati all'inulina che è risultato rispettivamente pari al 22% mol/mol e 11 % mol/mol .

#### 4.2.4 Derivatizzazione dell' $\alpha,\beta$ -poli[N-(2-idrossietil)-D,L-aspartammide] con anidride metacrilica (PHM)

Il PHM è stato ottenuto seguendo una procedura già riportata in letteratura [Mandracchia D. et al., 2004].

In particolare, 2 g di  $\alpha,\beta$ -poli[N-(2-idrossietil)-D,L-aspartammide] sono stati solubilizzati in 40 ml di N,N-dimetilacetammide (DMA) anidra, quindi sono state aggiunte opportune quantità di trietilammina (TEA) e anidride metacrilica (MA), in accordo con i rapporti:

$$X = \frac{\text{moli di MA}}{\text{moli di unità ripetitive di PHEA}} = 0.5$$

$$Y = \frac{\text{moli di TEA}}{\text{moli di MA}} = 0.5$$

La reazione è stata tenuta a 40 °C sotto continua agitazione per 48 ore. Dopo tale tempo la miscela di reazione è stata precipitata in 400 ml di 2-propanolo e centrifugata per 10 minuti, a 10 000 rpm e a

4°C. Il prodotto è stato recuperato, lavato diverse volte con acetone ed essiccato sotto vuoto. Il copolimero PHM ottenuto è stato solubilizzato in 200 ml di acqua bidistillata e sottoposto a dialisi esaustiva usando Visking Dialysis Tubing (18/32) con limite di esclusione dimensionale 12 000 - 14 000 Da. Dopo la dialisi, la soluzione è stata essiccata mediante liofilizzazione. Il PHM è stato ottenuto con una resa del 98% (p/p) rispetto al PHEA di partenza. Il copolimero PHM è stato caratterizzato mediante analisi FT-IR, <sup>1</sup>HNMR e SEC. Il grado di derivatizzazione molare (DD) dei residui di MA legati al PHEA è stato del 30 % mol/mol .

#### **4.2.5 Preparazione degli idrogeli INUMASA/PHM o INUMASA/PHM/PEGDM mediante irradiazione UV**

150 mg/ml di una miscela degasata di soluzioni INUMASA/PHM 70:30 p/p in tampone fosfato (PBS) pH 6.8 con o senza PEGDM<sub>550</sub> (8% p/p rispetto ai polimeri), sono stati posti in *vials* di vetro. Quindi, all'interno di ogni *vials* è stato posizionato un pistone in vetro al fine di formare uno strato sottile (circa 2 mm) nello spazio di aria tra pistone e *vial*. I campioni sono stati irradiati a 366 nm per 30 minuti. Dopo l'irradiazione, gli idrogeli sono stati recuperati e liofilizzati.

#### **4.2.6 Studi di rigonfiamento degli idrogeli INUMASA/PHM o INUMASA/PHM/PEGDM**

Aliquote, esattamente pesate, degli idrogeli INUMASA/PHM o INUMASA/PHM/PEGDM sono state poste in un tubo in vetro, da 5 ml, che presenta all'estremità inferiore un filtro di vetro sinterizzato (Ø 10 mm; porosità G3); gli idrogeli sono stati lasciati rigonfiare a  $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$  immergendo il filtro più il supporto in un *beaker*

contenente il mezzo di rigonfiamento. In particolare, gli idrogeli INUMASA/PHM e INUMASA/PHM/PEGDM sono stati lasciati rigonfiare in acqua bidistillata fino a 24 ore a  $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$  e, a intervalli di tempo stabiliti, il peso degli idrogeli rigonfi è stato valutato dopo percolazione dei filtri contenenti l'idrogel a pressione atmosferica e successiva centrifugazione a 3000 rpm per 5 minuti. Gli studi di rigonfiamento sono stati anche eseguiti in HCl 0.1 N (pH 1.0) (fluido gastrico simulato) per 2 ore e successivamente, in tampone fosfato pH 6.8 (fluido intestinale simulato) fino a 24 ore. La tara del filtro è stata determinata dopo centrifugazione con sola acqua. Il valore del rapporto di rigonfiamento ( $q$ ) è stato calcolato secondo la formula

$$q = W_s/W_d$$

dove  $W_s$  e  $W_d$  sono i pesi del campione rigonfio e secco, rispettivamente.

Ogni esperimento è stato condotto in triplicato.

#### **4.2.7 Studi di degradazione *in vitro* degli idrogeli INUMASA/PHM o INUMASA/PHM/PEGDM mediante inulinasi**

Aliquote (50 mg) degli idrogeli INUMASA/PHM o INUMASA/PHM/PEGDM sono state incubate con 25 ml di una soluzione di tampone fosfato pH 4.7 in assenza o in presenza di inulinasi (concentrazione finale dell'enzima 10 U/ml), sotto continua agitazione (100 rpm) a  $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$  da 1 ora fino a 24 ore. La soluzione dell'enzima è stata preparata immediatamente prima dell'esperimento. La degradazione dei campioni è stata valutata usando il metodo dell'antrone seguendo una procedura altrove riportata [Pitarresi G. *et al.*, 2008 (B)]. Ogni esperimento è stato condotto in triplicato.

#### 4.2.8 Coltura cellulare

Le cellule Caco-2 sono state mantenute nel mezzo MEM contenente 10 vol-% di siero fetale bovino (FCS), 2 mM L-glutamina, 100 U/ml di penicillina, 100 µg/ml di streptomina, 2.5 µg/ml amfotericina B (Sigma Aldrich, Italia), sotto condizioni standard (95% di umidità relativa, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C). Le cellule Caco-2 sono state piastrate ad una densità di  $1 \times 10^5$  cellule/ml su una piastra a 96 pozzetti.

#### 4.2.9 Studi di compatibilità cellulare *in vitro*

La compatibilità cellulare degli idrogeli INUMASA/PHM o INUMASA/PHM/PEGDM è stata valutata *in vitro*, sia mediante un metodo “diretto” sia mediante un metodo “indiretto”, usando le cellule Caco-2 con una vitalità di  $98 \pm 1\%$ , come rivelato dal saggio di esclusione del *trypan blue*. Prima delle analisi, ogni idrogel è stato sterilizzato mediante lavaggio con etanolo al 96% (v/v) per 30 min ed essiccato a temperatura ambiente sotto cappa sterile.

Metodo diretto. Le cellule Caco-2 sono state incubate in contatto con ciascun idrogel, in MEM completo (2,5 o 5 mg di campione per ml di mezzo), a 37°C e 5% di CO<sub>2</sub>. Dopo incubazione, la vitalità cellulare è stata valutata mediante il saggio MTS. In particolare, le cellule Caco-2 in MEM completo sono state seminate in una piastra a 96 pozzetti a  $1 \times 10^5$  cellule/ml (0.1 ml per pozzetto) e incubate a  $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$  e a 5% di CO<sub>2</sub> per 48 ore. Quindi, il mezzo è stato sostituito con MEM completo fresco e l'idrogel essiccato è stato aggiunto in ciascun pozzetto. Dopo 48 ore di incubazione, il mezzo e l'idrogel sono stati rimossi da ogni pozzetto e sostituiti con mezzo fresco, quindi 20 µl di reagente MTS sono stati aggiunti in ogni pozzetto. Dopo 2 ore di incubazione, è stata registrata l'assorbanza a 492 nm e sono stati

calcolati i dati di vitalità cellulare. La vitalità cellulare relativa (in percentuale) è stata espressa come  $(\text{Abs}_{492} \text{ cellule trattate} / \text{Abs}_{492} \text{ cellule controllo}) \times 100$ . Le cellule incubate in MEM in assenza dell'idrogel, sono state usate come controllo.

Ogni esperimento è stato eseguito in triplicato.

Metodo indiretto. La vitalità delle cellule Caco-2 coltivate in un mezzo in cui ogni idrogel è stato sospeso e fatto rigonfiare (indicato come mezzo condizionato) è stata valutata tramite MTS. In particolare, gli idrogel sono stati incubati in MEM con FCS a  $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$  per 5 giorni sotto agitazione orbitale a 120 rpm. Dopo incubazione, il mezzo condizionato è stato centrifugato a 11800 rpm, a  $4^\circ\text{C}$  per 30 minuti, quindi filtrato per rimuovere l'idrogel rigonfiato. Le cellule Caco-2 sono state seminate a  $1 \times 10^5$  cellule/ml in una piastra a 96 pozzetti (0.1 ml per pozzetto) e incubate a  $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$  al 5% di  $\text{CO}_2$  per 48 ore. Successivamente, il mezzo di coltura è stato sostituito con il mezzo condizionato addizionato con FCS 10% v/v. Dopo 48 ore di incubazione ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) la vitalità cellulare è stata valutata mediante il saggio MTS. Le cellule incubate in MEM sono state usate come controllo.

Ogni esperimento è stato eseguito in triplicato.

#### **4.2.10 Effetto dell'irradiazione UV sulle IgG**

100  $\mu\text{l}$  di una soluzione 10 mg/ml di IgG in tampone fosfato a pH 6.8 sono stati aggiunti a 900  $\mu\text{l}$  di PBS pH 6.8 (1 mg/ml) e sottoposti a irradiazione UV a 366 nm per 5, 15, 30, 45, 60, o 120 minuti. I campioni recuperati sono stati analizzati allo spettrofotometro UV e mediante SE-HPLC.

#### **4.2.11 Caricamento delle IgG negli idrogel INUMASA/PHM o INUMASA/PHM/PEGDM**

Le IgG sono state caricate negli idrogeli INUMASA/PHM o INUMASA/PHM/PEGDM durante l'irradiazione UV. In particolare, 100  $\mu$ l di una soluzione di IgG 10 mg/ml in tampone fosfato pH 6.8 sono stati aggiunti alle soluzioni contenenti i polimeri, mantenendo la concentrazione delle IgG a 1 mg/ml e le concentrazioni dei polimeri a 150 mg/ml. Le soluzioni proteina-polimeri sono state irradiate a 366 nm per 30 minuti.

Gli idrogeli ottenuti, caricati con le IgG, sono stati recuperati prima o dopo liofilizzazione e testati per il rilascio delle IgG.

#### **4.2.12 Studi di rilascio delle IgG dagli idrogel INUMASA/PHM o INUMASA/PHM/PEGDM**

Aliquote degli idrogel INUMASA/PHM o INUMASA/PHM/PEGDM caricati con le IgG, recuperate prima o dopo liofilizzazione, sono state disperse in *vials* contenenti 10 ml di PBS pH 6.8 e mantenute a  $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$  sotto agitazione (100 rpm) fino a 24 ore. In particolare, i campioni raccolti dopo liofilizzazione sono stati ridotti in polvere e le aliquote sono state di 15 e 16 mg per INUMASA/PHM e INUMASA/PHM/PEGDM, rispettivamente, mentre per i gel raccolti prima della liofilizzazione le aliquote sono state di 114 e 120 mg per INUMASA/PHM e INUMASA/PHM/PEGDM, rispettivamente. In ogni caso, ogni aliquota analizzata nell'esperimento di rilascio contiene 0.1 mg di IgG. Le condizioni *sink* sono state mantenute per tutta la durata dell'esperimento. A intervalli di tempo stabiliti, i campioni sono stati filtrati attraverso filtri Millipore da 0.45  $\mu$ m e analizzati mediante SE-HPLC per quantificare le IgG rilasciate. E'

stata ottenuta una curva di calibrazione usando soluzioni standard di IgG nel range di concentrazione 0.001-1 mg/ml ( $R^2=1$ ,  $y=0.0007X-8E-5$ ). Gli stessi campioni sono stati testati mediante ELISA per valutare sia la quantità rilasciata sia l'attività delle IgG rilasciate. In particolare, 25  $\mu$ l di ciascuna aliquota rilasciata, sono stati diluiti a 2 ml aggiungendo ELISA *manufacturer Sample Diluent*, quindi, 100  $\mu$ l di queste soluzioni sono state aggiunte ai pozzetti ricoperti dall'antigene ed è stata valutata l'assorbanza finale a 450 nm mediante un lettore di micropiastre. E' stata preparata una curva di calibrazione usando soluzioni standard di IgG nel range di concentrazione 7.8-500 ng/ml ( $R^2=0.999$ ).

Ogni esperimento è stato condotto in triplicato.

#### **4.2.13 Analisi statistiche**

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato e i risultati sono stati riportati come media  $\pm$  deviazione standard.



### **4.3 SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DI IDROGELI A BASE DEL DERIVATO DIVINILSULFONICO DELL'INULINA PER LA VEICOLAZIONE DI FARMACI LIPOFILI**

#### **4.3.1 Materiali**

Inulina (INU) estratta da Dahlia Tubers  $M_w \approx 5000$  Da, etere dietilico, divinil sulfone  $\geq 98.0$  % (DV), *O,O'*-Bis(2-aminoetil)polietileneglicole (PEGBa)  $M_w \approx 2000$  Da, inulinasi da *Aspergillus niger* (INU-ase) e trietilammina (TEA) sono stati acquistati alla Fluka (Italia). N,N-dimetilformamide anidra 99.9 % (DMF), etanolo, acetone, flutamide, 2-idrossiflutamide, Tween 80 e mucina di stomaco suino sono stati acquistati alla Aldrich Chimica (Italia). Acido fosforico e acetonitrile per HPLC *gradient grade* sono stati acquistati alla VWR .

Le compresse di “Flutamide Teva” sono state acquistate in farmacia. Gli standard di Pullulano per l’analisi SEC sono stati acquistati alla Polymer Laboratories (Germania). Le cellule Caco-2 sono state acquistate all’ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell’Emilia Romagna “Bruno Umbertini” (Italia).

#### **4.3.2 Apparecchiature**

Il peso molecolare dell’INUDV è stato determinato tramite un sistema SEC equipaggiato con una pompa ed un rifrattometro differenziale 410 (DRI) come rilevatore di concentrazione, il tutto acquistato alla Waters. Sono state impiegate come colonne, una Ultrahydrogel 1 000 (con *range* di esclusione dimensionale di 10 000-500 000) ed una Ultrahydrogel 250 (con *range* di esclusione dimensionale di 1000-

50000), entrambe acquistate alla Waters. Come fase mobile è stata impiegata una soluzione 0.05 M di tampone fosfato (PBS) pH 7.2 a  $35 \pm 0.1^\circ\text{C}$  ed un flusso di 0.6 ml/min. Come standard è stato usato il Pullulano (range Mw 300-150 000 Da).

Gli spettri  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) sono stati ottenuti con uno strumento Bruker Avance<sup>II</sup> 300 MHz.

Gli spettri FT-IR sono stati registrati su pastiglie di KBr nel *range* di 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  usando uno Spettrofotometro Perkin-Elmer 1720 Fourier Transform con una risoluzione di 1  $\text{cm}^{-1}$ ; ogni spettro è stato registrato dopo 100 scansioni.

Le centrifugazioni sono state eseguite con una centrifuga Beckman Coulter Allegra X-22R equipaggiata con un rotore ad angolo fisso F0850 e un sistema refrigerante.

Gli studi di degradazione sono stati realizzati in un Benchtop 80  $^\circ\text{C}$  Incubator Orbital Shaker modello 420.

Per valutare la vitalità cellulare dopo il test MTS è stato utilizzato un fotometro microplate Thermo Labsystems Multiskan Ex a 96 pozzetti.

La distribuzione dimensionale delle microparticelle e l'analisi qualitativa della mucoadesione sono state determinate mediante un analizzatore di immagini Leica Quantimet Q500 dotato di uno stereomicroscopio Leica Wild 3D. L'analizzatore di immagini calcola l'area particellare e la converte in diametro equivalente.

L'analisi di diffrazione ai raggi X è stata condotta usando un diffrattometro Philips PW 1729. I parametri sperimentali sono stati fissati come segue: radiazione  $\text{CuK } \alpha$ , tube setting 40 KV, 20 mA; velocità angolare  $2^\circ$  ( $2 \theta/\text{min}$ ); intervallo di tempo 1 sec, velocità della carta 2 cm/min.

Gli studi di rilascio sono stati eseguiti utilizzando un incubatore Orbital Shaker 420, alla temperatura di  $37 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ , alla velocità di rotazione di 100 rpm.

Le analisi HPLC sono state eseguite utilizzando un cromatografo Agilent 1100 Series dotato di un iniettore Rheodyne 7125 (fornito di un loop di 20  $\mu\text{l}$ ) e un detector HDLC Agilent 1100. È stata usata una colonna Waters  $\text{C}_{18}$  e come fase mobile una soluzione di acetonitrile/acido fosforico (0,1% p/v) in rapporto 55:45, con un flusso di 1 ml/min. L'analisi è stata effettuata a una lunghezza d'onda di assorbimento pari a 302 nm. Il contenuto di flutamide rilasciata dall'idrogel è stato valutato utilizzando una curva di taratura determinata nel *range* di concentrazione 0.1 – 0.002 mg/ml in HCl/Tween 80 3% (p/v) ( $y = 25814 x + 25,603$  con  $R^2 = 0.9983$ ) e nel *range* di concentrazione 0.0781 – 0.00488 mg/ml in HCl 0.1 N/Tween 80 3% (p/v)/ $\text{Na}_3\text{PO}_4$  0,2 M/NaOH 1 N pH 6.8 ( $y = 21999 x - 13,478$  con  $R^2 = 0.9991$ ).

#### 4.3.3 Sintesi del derivato INUDV

Prima dell'utilizzo, l'inulina (INU) è stata seccata in stufa a  $70^{\circ}\text{C}$  per 24 ore. Un grammo di inulina è stato disperso in 20 ml di DMF anidra in atmosfera di argon per almeno 3 ore. Dopo la completa solubilizzazione, sempre sotto agitazione e sotto argon, è stata aggiunta una quantità opportuna di divinil sulfone (DV) secondo il rapporto:

$$X = \frac{\text{moli di DV}}{\text{moli di unità ripetitive di INU}} = 5$$

Dopo tre minuti, una quantità opportuna di trietilammina (TEA) è stata aggiunta secondo il valore:

$$Y = \frac{\text{moli di TEA}}{\text{moli di unità ripetitive di INU}} = 5$$

La miscela di reazione è stata posta in un bagno termostato e fatta agitare a 60 °C sotto atmosfera di argon per 24 ore. Dopo tale periodo, la miscela di reazione è stata precipitata in 400 ml di etere etilico e centrifugata per 15 min a 9800 rpm e a 4 °C. Il prodotto è stato lavato con etere etilico (5 x 50 ml) e poi essiccato sotto vuoto.

Il prodotto finale, siglato come INUDV, è stato ottenuto con una resa in peso rispetto all'inulina di partenza pari al 92% p/p, ed in seguito è stato caratterizzato mediante studi FT-IR, <sup>1</sup>H-NMR e SEC.

#### 4.3.4 Caratterizzazione del derivato INUDV

Lo spettro FT-IR (KBr) ha mostrato una banda larga a 3400 cm<sup>-1</sup> (ν<sub>as</sub> OH); bande a 1311 cm<sup>-1</sup> (ν<sub>as</sub> O=S=O), 1294 cm<sup>-1</sup> (scissoring-C=CH<sub>2</sub>), 1127 cm<sup>-1</sup> (ν<sub>s</sub> O=S=O) e 761 cm<sup>-1</sup> (wagging -C=CH<sub>2</sub>).

Lo spettro <sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O) ha mostrato: δ 3.20-4.0 (5H, m: -CH<sub>2</sub>-OH; CH-CH<sub>2</sub>-OH; -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-), δ 4.14 (1H, t: CH-OH), δ 4.25 (1H, d: CH-OH), δ 6.21 (2H, m: CH<sub>2</sub>=) e δ 6.77 (1H, m: =CH-).

Il grado di derivatizzazione (DD %) in DV è stata determinato mediante <sup>1</sup>H-NMR: il contenuto in residui vinilsulfonici è stato calcolato comparando l'integrale dei picchi a δ 6.21 e a δ 6.77 (3H, 2m: CH<sub>2</sub>=CH-) relativi ai protoni del doppio legame del divinil sulfone, con i picchi compresi tra δ 3.20-4.25 relativi ai protoni delle

unità di fruttosio dell'inulina ( $7 \text{ H}^+$ ). Il valore di DD % in DV è risultato essere pari a  $25 \pm 3 \text{ \% mol/mol}$ .

#### 4.3.5 Preparazione degli idrogeli INUDV/PEGBa

Gli idrogeli di INUDV/PEGBa sono stati preparati variando la quantità di PEGBa, secondo i valori:

$$Z = \frac{\text{moli di PEGBa}}{\text{moli di unità ripetitive di INUDV portanti gruppi divinil sulfonici}} = 0.5, 0.8 \text{ o } 1.0$$

considerando un DD in DV di 25% mol/mol rispetto all'inulina.

In particolare, 100 mg del derivato INUDV sono stati solubilizzati in 400  $\mu\text{l}$  di una soluzione di tampone fosfato (PBS) pH 7.4, a temperatura ambiente, e degasati sotto vuoto.

Separatamente, 132, 211 o 264 mg di PEGBa sono stati solubilizzati in 600  $\mu\text{l}$  di una soluzione di tampone fosfato (PBS) pH 7.4, a temperatura ambiente e degasati sotto vuoto.

Quindi, 400  $\mu\text{l}$  della soluzione di INUDV sono stati aggiunti ad ogni soluzione di PEGBa e la reazione di *crosslinking* è stata condotta per 4 ore a temperatura ambiente. Trascorso questo tempo, gli idrogeli siglati come INUDV/PEGBa-A, INUDV/PEGBa-B e INUDV/PEGBa-C ottenuti rispettivamente secondo i valori  $Z=0.5, 0.8$  o  $1.0$ , rispettivamente, sono stati recuperati, lavati con acqua distillata ( $5 \times 50 \text{ ml}$ ) e liofilizzati.

#### 4.3.6 Studi di *swelling*

Aliquote (30 mg) degli idrogeli INUDV/PEGBa-A, INUDV/PEGBa-B o INUDV/PEGBa-C sono stati posti in filtri di vetro sinterizzato, di 5 ml ognuno, ( $\varnothing$  10 mm; porosità, G3) e lasciati swellare a  $37 \pm 0.1$  °C per 24 ore immergendo il filtro più il supporto in un *becker* contenente acqua bidistillata. A tempi stabiliti, è stato valutato il peso di ogni idrogel, dopo essere stati percolati a pressione atmosferica e centrifugati a 3000 rpm per 5 minuti. Lo *swelling* è stato anche valutato in HCl 0.1 N, pH 1.0 (simulante il fluido gastrico) per 2 ore, e in tampone fosfato pH 6.8 (simulante il fluido intestinale) fino alle 24 ore. La tara del filtro è stata determinata ponendo il filtro in acqua, centrifugandolo e poi pesandolo.

Il rapporto di *swelling* (q) è stato calcolato secondo il rapporto:

$$q = W_s/W_d$$

in cui  $W_s$  e  $W_d$  sono rispettivamente i pesi del campione swellato e di quello secco.

Ogni esperimento è stato condotto in triplicato.

#### 4.3.7 Studi di idrolisi chimica in fluido gastrico simulato

Aliquote (30 mg) degli idrogeli INUDV/PEGBa-A, INUDV/PEGBa-B e INUDV/PEGBa-C sono state incubate con 6 ml di HCl 0.1 N sotto continua agitazione (100rpm) a  $37 \pm 0.1$  °C per 2 ore. Trascorso questo tempo, ogni campione è stato recuperato dopo centrifugazione (15 min, 10000 rpm, 4 °C) e lavato con acqua distillata ( $5 \times 50$  ml) sotto continua agitazione per 30 min, allo scopo di estrarre prodotti di degradazione del polimero intrappolati dentro il *network*.

I campioni sono stati liofilizzati e pesati. La degradazione è stata espressa come:

$$\text{Degradazione \%} = \frac{p_i - p_f}{p_i} \times 100$$

$p_i$  = peso dell'idrogel di partenza

$p_f$  = peso dell'idrogel recuperato dopo la degradazione

Ogni esperimento è stato condotto in triplicato.

#### **4.3.8 Studi di degradazione enzimatica con inulinasi**

Aliquote (30 mg) degli idrogeli di INUDV/PEGBa-A, INUDV/PEGBa-B e INUDV/PEGBa-C sono stati incubati con 10 ml di tampone fosfato pH 4.7 in assenza e in presenza di inulinasi (concentrazione finale dell'enzima pari a 10 U/ml), sotto continua agitazione (100 rpm) a  $37 \pm 0.1$  °C per 24 ore. La soluzione di enzima è stata preparata immediatamente prima dell'esperimento.

La degradazione dei campioni è stata valutata mediante il metodo dell'antrone, seguendo una procedura altrove riportata [Pitarresi G. *et al.*, 2008 (B)].

Ogni esperimento è stato condotto in triplicato.

#### **4.3.9 Coltura cellulare**

Cellule Caco-2 sono state poste in MEM contenente 10% (v/v) di siero bovino fetale (FCS), 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicillina, 100 µg/ml streptomocina, 2,5 µg/ml amfotericina B (Sigma Aldrich, Italy), in condizioni standard (95% di umidità relativa, 5% CO<sub>2</sub>, 37°

C). Le cellule Caco-2 sono state poste con una densità di  $1 \times 10^5$  cell/ml su una piastra da 96 pozzetti.

#### **4.3.9.1 Studi di compatibilità cellulare in vitro**

La compatibilità cellulare degli idrogeli INUDV/PEGBa-A, INUDV/PEGBa-B e INUDV/PEGBa-C è stata valutata *in vitro*, mediante il *metodo “diretto”* e *“indiretto”*, utilizzando le cellule Caco-2 con una vitalità di  $98 \pm 1$  %, come rivelato dal saggio di esclusione del *trypan blue*. Prima dell'analisi, ogni idrogel è stato sterilizzato mediante lavaggio con etanolo al 96% (v/v) per 30 minuti ed essiccato a temperatura ambiente sotto cappa sterile.

**Metodo diretto.** Le cellule Caco-2 in MEM ricostituito sono state seminate in una piastra da 96 pozzetti alla densità di  $1 \times 10^5$  cell/ml (0.1 ml per pozzetto) e incubate a  $37 \pm 0.1$  °C con il 5% di CO<sub>2</sub> fino a quando esse raggiungono un monostrato di confluenza.

In seguito, il mezzo è stato sostituito con MEM ricostituito fresco e ogni idrogel liofilizzato (2.5 mg) è stato aggiunto ad ogni pozzetto. Dopo 24 o 48 ore di incubazione, il mezzo e l'idrogel sono stati rimossi da ogni pozzetto e sostituiti con mezzo fresco, e sono stati aggiunti 20 µl di reagente MTS per ogni pozzetto. Dopo 2 ore di incubazione, è stata registrata l'assorbanza a 492 nm e sono stati calcolati i dati di vitalità cellulare. La vitalità cellulare relativa è stata espressa come

$$(\text{Abs}_{492} \text{ delle cellule trattate} / \text{Abs}_{492} \text{ delle cellule di controllo}) \times 100.$$

Le cellule incubate in MEM in assenza dell' idrogel, sono state usate come controllo. Ogni esperimento è stato condotto in triplicato.



**Metodo Indiretto.** La vitalità delle cellule Caco-2, coltivate in un mezzo in cui ogni idrogel è stato sospeso e ha rigonfiato (definito come “mezzo condizionato”), è stata valutata mediante il test MTS. In particolare, ogni idrogel (2.5 mg per ml di mezzo) è stato incubato in MEM privo di FCS a  $37 \pm 0.1^\circ \text{C}$  per 5 giorni sotto agitazione orbitale a 120 rpm. Dopo incubazione, il mezzo (“mezzo condizionato”) è stato centrifugato a 11800 rpm, a  $4^\circ \text{C}$  per 30 minuti, poi filtrato per rimuovere l'idrogel. Le cellule Caco-2 in MEM ricostituito sono state seminate in una piastra da 96 pozzetti alla densità di  $1 \times 10^5$  cell/ml (0.1 ml per pozzetto) e incubate a  $37 \pm 0.1^\circ \text{C}$  con il 5% di  $\text{CO}_2$  fino a quando esse raggiungono un monostrato di confluenza. Successivamente, il mezzo di coltura è stato sostituito con il mezzo “condizionato” integrato con 10 % v/v di FCS.

Dopo 24 e 48 ore di incubazione ( $37 \pm 0.1^\circ \text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) la vitalità cellulare è stata saggiata mediante il test MTS, come descritto sopra. Le cellule incubate in MEM sono state usate come controllo. Ogni esperimento è stato condotto in triplicato.

#### 4.3.10 Studi di mucoadesione

Gli studi di mucoadesione sono stati eseguiti ponendo su quattro filtri di acetato di cellulosa ( $0.45 \mu\text{m}$ ) dispersioni di mucina di stomaco suino in HCl 0.1 N pH 1.0 o in tampone fosfato pH 6.8 alla concentrazione 0.1 mg/ml. Le dispersioni sono state lasciate ad incubare rispettivamente per 2 o 24 ore a  $37 \pm 0.1^\circ \text{C}$  a 100 rpm. Dopo tale tempo, due di questi filtri sono stati lavati con le rispettive soluzioni in cui è stata dispersa la mucina e posti ad essiccare.

Tali filtri rappresentano il “bianco”.

Sugli altri due filtri sono stati seminati circa 200  $\mu$ l delle dispersioni dell'idrogel INUDV/PEGBa-C in forma microparticellare in HCl 0.1 N pH 1.0 o in tampone fosfato pH 6.8 alla concentrazione 10 mg/ml. Le dispersioni sono state lasciate ad incubare rispettivamente per 2 e per 24 ore a 37°C a 100 rpm. Dopo tale tempo, i filtri sono stati lavati con le rispettive soluzioni in cui sono state disperse le aliquote di idrogel e posti ad essiccare. L'adesione del microgel è stata valutata mediante analisi qualitativa (analisi al Quantimet e analisi SEM) e quantitativa (determinazione del peso di idrogel che rimane adeso al filtro contenente la mucina).

Ogni esperimento è stato condotto in triplicato.

#### **4.3.11 Caricamento dell'idrogel INUDV/PEGBa-C con flutamide mediante impregnazione**

Un'aliquota dell'idrogel (50 mg) INUDV/PEGBa-C è stata posta a contatto con una soluzione concentrata di farmaco in etanolo (50 mg/ml) e lasciata a rigonfiare a temperatura ambiente per 3 giorni. Dopo tale periodo il gel è stato essiccato sotto vuoto e su questo sono state eseguite prove di rilascio *in vitro* a diversi pH, monitorando all'HPLC la quantità di farmaco rilasciata.

#### **4.3.12 Determinazione della quantità di farmaco incorporata nell'idrogel**

Aliquote di 50 mg dell'idrogel INUDV/PEGBa-C sono state messe a contatto con etanolo a temperatura ambiente fino ad estrazione esaustiva del farmaco.

La quantità di flutamide rilasciata è stata determinata mediante analisi UV alla lunghezza d'onda di 302 nm. È stata trovata una quantità di flutamide pari al  $32 \pm 1\%$  p/p.

Ogni esperimento è stato condotto in triplicato.

#### 4.3.13 Studi di rilascio

Aliquote (10 mg) di idrogel INUDV/PEGBa-C caricato con la flutamide, sono state disperse in *becker* contenenti 40 ml di una soluzione di HCl 0.1 N pH 1.0 in miscela con il Tween 80 al 3% p/v e mantenuti a  $37 \pm 0.1^\circ \text{C}$  sotto agitazione in un incubatore per 2 ore a 100 rpm. Poiché il rilascio del farmaco dopo 2 ore di incubazione a pH 1.0 non era completo è stata aggiunta una miscela di fosfato sodico tribasico 0.2 M/ NaOH 1 N per portare il pH a 6.8 (fluido intestinale simulato) fino a 24 ore in accordo alla metodica riportata nella USP XXII. Per tutta la durata dell'esperimento sono state mantenute le condizioni *sink*. A precisi intervalli di tempo i campioni sono stati filtrati con filtri di acetato di cellulosa  $0.45 \mu\text{m}$  e la quantità di farmaco rilasciata è stata analizzata tramite HPLC.

Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato.

#### 4.3.14 Studi di dissoluzione della compressa e del farmaco libero

Aliquote di compressa di "Flutamide TEVA" (50 mg di compressa contenenti 16.5 mg di principio attivo) e di flutamide (16.5 mg) come farmaco libero, sono state separatamente disperse in due *becker* contenenti 40 ml di una soluzione di HCl 0.1 N pH 1.0 in miscela con il Tween 80 al 3% p/v e mantenuti a  $37 \pm 0.1^\circ \text{C}$  sotto agitazione in un incubatore per 2 ore a 100 rpm. Poiché la dissoluzione del farmaco dopo 2 ore di incubazione a pH 1.0 non era completa è stata aggiunta

una miscela di fosfato sodico tribasico 0.2 M/ NaOH 1 N per portare il pH a 6.8 (fluido intestinale simulato) fino a 24 ore in accordo alla metodica riportata nella USP XXII. Per tutta la durata dell'esperimento sono state mantenute le condizioni *sink*. A precisi intervalli di tempo i campioni sono stati filtrati con filtri di acetato di cellulosa 0.45  $\mu\text{m}$  e la quantità di farmaco dissolta è stata analizzata tramite HPLC.

Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato.

#### **4.3.16 Analisi statistiche**

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato e i risultati sono stati riportati come media  $\pm$  deviazione standard.

## 5. BIBLIOGRAFIA

- Allen C., Maysinger D., Eisenberg A. *Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery*. Colloids and Surface B: Biointerfaces, **1999**, 16, 3-27.
- Allen C., Yu Y., Maysinger D., Eisenberg A. *Polycaprolactone-b-poly(ethylene Oxide) Block Copolymer Micelles as a Novel Drug Delivery Vehicle for Neurotrophic Agents FK506 and L-685,818*. Bioconj. Chem., **1998**, 9, 564-572.
- Allen T.M., Hansen C.B., Lopes de Menezes D.E. *Pharmacokinetics of long-circulating liposomes*. Adv. Drug Deliv. Rev., **1995**, 16, 267-284.
- Amsden B. *Solute diffusion within hydrogels. Mechanisms and models*. Macromolecules, **1998**, 31, 8382–8395.
- Anseth K.S., Bowman C.N., Brannon-Peppas L. *Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination*. Biomaterials, **1996**, 17, 1647–1657.
- Aoki T., Kawashima M., Katono H., Sanui K., Ogata N., Okano T., Sakurai Y. *Temperature-responsive interpenetrating polymer networks constructed with poly(acrylic acid) and poly(N,N-dimethylacrylamide)*. Macromolecules, **1994**, 27, 947-952.
- Astareva I., Zhong X., Eisenberg F.A. *Critical micellization phenomena in block polyelectrolyte solutions*. Macromolecules, **1993**, 26, 7339-7352.
- Bae Y., Jang W.D., Nishiyama N., Fukushima S., Kataoka K. *Multifunctional polymeric micelles with folate mediated cancer cell*

*targeting and pH-triggered drug releasing properties for active intracellular drug delivery.* Mol. Biosyst, **2005**, 1, 241-250.

- Bae Y.H., Okano T., Kim S.W. “On-Off” thermocontrol of solute transport. Part 2. Solute release from thermosensitive hydrogels. Pharm. Res. **1991**, 8, 624-628.
- Bai L., Gu F., Feng Y., Liu Y. Synthesis of microporous pH-sensitive polyacrylic acid/poly(ethyleneglycol) hydrogels initiated by Potassium diperiodatocuprate (III). Iran. Polym. J., **2008**, 17, 325-332.
- Basit A., Bloor J. Prespectives on colonic drug delivery, Business briefing. Pharmtech, **2003**, 185-190.
- Biancone L., Cretella M., Tosti C., Palmieri G., Petruzzello C., Geremia A., Calabrese E., Pallone F. Local injection of infliximab in the postoperative recurrence of Crohn’s disease. Gastrointestinal Endoscopy, **2006**, 63, 486-492.
- Bulmus V., Ding Z., Long C.J., Stayton P.S., Hoffman A.S. Site-specific polymer–streptavidin bioconjugate for pH controlled binding and triggered release of biotin. Bioconjugate Chem, **2000**, 11, 78-83.
- Buscemi S., Pace A., Palumbo Piccionello A., Pibiri I., Vivona N., Giorgi G., Mazzanti A., Spinelli D. Five-to-Six Membered Ring-Rearrangements in the Reaction of 5-Perfluoroalkyl-1,2,4-oxadiazoles with Hydrazine and Methylhydrazine. J. Org. Chem. **2006**, 71, 8106-8113 (A).
- Buscemi S., Pace A., Palumbo Piccionello A., Vivona N. Synthesis of fluorinated first generation starburst molecules containing a triethanolamine core and 1,2,4-oxadiazoles. J. Fluorine Chem. **2006**, 127, 1601-1605 (B).

- Butun V., Armes S.P., Billingham N.C. *Synthesis and aqueous solution properties of near-monodisperse tertiary amine methacrylate homopolymers and diblock copolymers*. Polymer, **2001**, 42, 5993-6008.
- Campbell I.G., Jones T.A., Foulkes W.D., Trowsdale J. *Folate-binding protein is a marker for ovarian cancer*. Cancer Res., **1991**, 51, 5329-5338.
- Casadei M.A., Pitarresi G., Calabrese R., Paolicelli P., Giammona G. *Biodegradable and pH-sensitive hydrogels for potential colon-specific drug delivery: characterization and in vitro release studies*. Biomacromolecules, **2008**, 9, 43-49.
- Casellas F., Borrueal N., Torrejon A., Varela E., Antolin M., Guarner F., Malagelada J.R. *Oral oligofructose-enriched inulin supplementation in acute ulcerative colitis is well tolerated and associated with lowered faecal calprotectin*. Aliment. Pharmacol. Ther., **2007**, 25, 1061–1067.
- Cavallaro G., Licciardi M., Caliceti P., Salmaso S., Giammona G. *Synthesis, physico-chemical and biological characterization of a paclitaxel macromolecular prodrug*. Eur. J. Pharm. Biopharm., **2004**, 58, 151-159 (A).
- Cavallaro G., Licciardi M., Giammona G., Caliceti P., Semenzato A., Salmaso S. *Poly(hydroxyethylaspartamide) derivatives as colloidal drug carrier systems*. J. Of Controlled Release, **2003**, 89 285-295.
- Cavallaro G., Maniscalco L., Licciardi M., Giammona G. *Tamoxifen-Loaded Polymeric Micelles: Preparation, Physico-*

*Chemical Characterization and In Vitro Evaluation Studies.* Macromolecular Bioscience, **2004**, 4, 1028 (B).

- Chan J.M., Zhang L., Yuet KP., Liao G., Rhee JW., Langer R. *PLGA–lecithin PEG core-shell nanoparticles for controlled drug delivery.* Biomaterials, **2009**, 30, 1627-1634.
- Chourasia M.K., Jain S. K. *Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems.* J. Pharm. Sci., **2003**, 6, 33-66.
- Choy Y.B., Park J-H., Prausnitz M.R. *Mucohadesive microparticles engineered for ophthalmic drug delivery.* J. Of Physics and Chemistry of Solids, **2008**, 69, 1533-1536.
- Craparo E.F., Cavallaro G., Bondi M.L., Mandracchia D., Giammona G. *Pegylated nanoparticles based on a polyaspartamide. Preparation, physico-chemical characterization, and intracellular uptake.* Biomacromolecules, **2006**, 7, 3083-3092.
- Creutz S., Van Stam J.J., De Schryver F.C., Jerome R. *Dynamics of Poly((dimethylamino)alkyl methacrylate-block-sodium methacrylate) Micelles. Influence of Hydrophobicity and Molecular Architecture on the Exchange Rate of Copolymer Molecules.* Macromolecules, **1998**, 31, 681.
- Cummings, J.H., Milojevic, S., Harding, M., Coward, W.A., Gibson, G.R., Botham, R.L., Ring, S.G., Wraight, E.P., Stockham, M.A., Alwood, M.C., Newton, J.M. *In-vivo studies of amylase and ethylcellulose coated <sup>13</sup>C glucose microspheres as a model for drug delivery to the colon.* J. Control. Release, **1996**, 40, 123–131.
- Dong L.C., Hoffmann A.S. *Synthesis and application of thermally reversible heterogels for drug delivery.* J. Controlled Release, **1990**, 13, 21-31.



- Dreborg S., Akerblom E. B. *Immunotherapy with monomethoxy polyethylene glycol modified allergens*. Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., **1990**, 6, 315-365.
- El-Sherif H., El-Masry M., Abou Taleb M.F. *pH-Sensitive Hydrogels Based on Bovine Serum Albmine for Anticancer Drug Delivery*. J. of Appl. Polymer Sci., **2010**, 115, 2050-2059.
- Englyst, H.N. and MacFarlane, G.T. *Breakdown of resistant and readily digestible starch of human gut bacteria*. J. Sci. Food Agric., **1986**, 37, 699–706.
- Flory P.J. *Principles of polymer chemistry*. Cornell University Press, New York, **1953**.
- Friend, D.R. *New oral delivery systems for treatment of inflammatory bowel disease*. Advanced Drug Delivery Reviews, **2005**, 57, 247–265.
- Ganong W.F. *Fisiologia Medica*. Piccin, **2008**, 389-395.
- Gao D., Xu H., Philibert M.A., Kopelman R. *Ultrafine hydrogel nanoparticles: synthetic aproach and therapeutic application in living cells*. Angew. Chem. Int., **2007**, 46, 2224-2227.
- Gao Z., Eisenberg A. *Model of micellization for block copolymers in solutions*. Macromolecules, **1993**, 26, 7353-7360.
- Giammona G., Carlisi B., Palazzo S. *Reaction of  $\alpha$ - $\beta$ ,poly(N-hydroxyethyl)-DL-aspartamide with derivatives of carboxylic acids*. J. Polym. Sci. Polym. Chem., **1987**, 40, 2813-2818.
- Giammona G., Pitarresi G. ,Craparo E.F., Cavallaro G., Buscemi S. *New biodegradable hydrogels based on a photo-cross-linkable polyaspartamide and poly(ethylene glycol) derivatives*.

*Release studies of an anticancer drug.* Colloid and Polymer Science, **2000**, 279 (8), 771-783.

- Gref R., Minamitake Y., Peracchia M.T., Trubetskoy V., Torchilin V., Langer R. *Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres.* Science, **1994**, 263, 1600-1603.
- Guarner F. *Inulin and oligofructose: impact on intestinal diseases and disorders.* B. J. Nutr. , **2005**, 93, Suppl. 1, S61-S65.
- Guo J.H., Skinner G.W., Harcum W.W., Barnum P.E. *Pharmaceutical applications of naturally occurring water-soluble polymers.* Pharm. Sci. Tech., **1998**, 1(6), 254-261.
- Hagan S.A., Coombes G.A., Garnett M.C., Dunn S.E., Davies M.C., Illum L., Davis S.S., Harding S.E., Purkiss S., Gellert P.R. *Poly(lactide-poly(ethylene glycol) copolymers as drug delivery systems*, **1996**. 1 Characterization of Water Dispersible Micelle-Forming Systems. *Langmuir*, 12(9), 2153-2161.
- Hanuer S.B. *Inflammatory bowel disease.* N. Engl. J. Med., 1996, 334,841-848.
- Harada A. and Kataoka K. *Novel Polyion Complex Micelles Entrapping Enzyme Molecules in the Core: Preparation of Narrowly-Distributed Micelles from Lysozyme and Poly(ethylene glycol)–Poly(aspartic acid) Block Copolymer in Aqueous Medium.* Macromolecules, **1998**, 31, 288-294.
- Harboe, E., Larsen, C., Johansen, M., and Olesen, H.P. *Macromolecular prodrugs. XIV. Absorption characteristics of naproxen after oral administration of dextran T-70-naproxen ester prodrugs in pigs.* Int. J. Pharm., **1989a**, 53,157– 165.

- Haupt S., Rubinstein A. *The colon as a possible target for orally administered peptide and protein drugs*. Crit. Rev. Therap. Drug Carr Syst., **2002**, 19 (6), 499–551.
- Hennink W.E., van Nostrum C.F. *Novel crosslinking methods to design hydrogels*. Adv. Drug Deliv. Rev., **2002**, 54, 13–36.
- Hoare TR., Kohane DS. *Hydrogels in drug delivery: progress and challenges*. Polymer, **2008**, 49, 1993-2007.
- Hollander, D. *Intestinal Permeability, leaky gut, and intestinal disorders*. Curr Gastroenterol Rep, **1999**, 1 (5), 410-416.
- Hovgaard L., Brondsted H. *Current applications of polysaccharides in colon targeting*. Crit. Rev. Ther. Drug, **1996**, 13, 185–223.
- Huang X., Brazel C.S. *Analysis of burst release of proxypheylline from poly(vinylalcohol) hydrogels*. Chem. Eng. Commun. 190, **2003**, 519–532.
- Hwang K.J., *Liposome pharmacokinetics*, in: M. J. Ostro (Ed.), *Liposomes: from Biophysics to Therapeutics*, Marcel Dekker, New York, **1987**, 109-156.
- Ingber D., Karp S., Plopper G., Hansen L., Mooney D.J. *Physical forces and the mammalian cell*. Academic Press, New York, **1993**, Chapter 2.
- Inoue T., Chen G., Nakamae K., Hoffman A. S. *An AB block copolymers of oligo(methyl methacrylate) and poly(acrylic acid) for micellar delivery of hydrophobic drugs*. J. Control. Release, **1998**, 51, 221-229.

- Jain A., Gupta Y., Jain S.K. *Azo-chemistry and its potential for colonic delivery*. Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., **2006**, 23(5), 349-400.
- Jain R.K. *Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors*. Adv. Drug Deliv. Rev., **1997**, 26, 71-90.
- Jeong B., Bae Y.H., Kim S.W. *Drug release from biodegradable injectable thermosensitive hydrogel of PEG-PLGA-PEG triblock copolymers*. J. Control. Release, **2000**, 63, 155–163.
- Jeong B., Gutowska A. *Lessons from nature: stimuli responsive polymers and their biomedical applications*. Trends Biotechnol, **2002**, 20, 305-311.
- Jones M.C. and Leroux J.C. *Polymeric micelles - a new generation of colloidal drug carriers*. Eur. J. of Pharm. and Biopharm., **1996**, 48, 101-111.
- Kabanov A.V., Kabanov V.A. *Interpolyelectrolyte and block ionomer complexes for gene delivery: physico-chemical aspects*. Adv. Drug Deliv. Rev., **1998**, 30, 49.
- Kalyanasundaram K., Thomas J.K. *Environmental effects on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micellar systems*. J. Am. Chem., **1977**, Soc. 99, 2039-2044.
- Kamada H., Tsutsumi Y., Yoshioka Y., Yamamoto Y., Kodaira H., Tsunoda S., Okamoto T., Mukai Y., Shibata H., Nakagawa S., Mayumi T. *Design of a pH-sensitive polymeric carrier for drug release and its application in cancer therapy*. Clin. Cancer Res., **2004**, 10, 2545-2550.

- Katayose S. and Kataoka K. *Remarkable increase in nuclease resistance of plasmid DNA through supramolecular assembly with poly(ethyleneglycol)-poly(L-lysine) block copolymer*. J. Pharm. Sci., **1998**, 87, 160.
- Khanh C.H., Mecozzi S. *Aqueous solubilization of highly fluorinated molecules by semifluorinated surfactant*. Langmuir, **2004**, 20, 7347-7350.
- Kim S., Healy K.E. *Synthesis and characterization of injectable poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) hydrogels with proteolytically degradable cross-links*. Biomacromolecules, **2003**, 4, 1214-1223.
- Kim S.W., Bae Y.H., Okano T. *Hydrogels: swelling, drug loading, and release*. Pharm. Res. **1992**, 9, 283–290.
- Kim S.Y., Shin I.G., Lee Y.M., Cho C.G., Sung Y.K. *Methoxy poly(ethylene glycol) and  $\epsilon$ -caprolactone amphiphilic block copolymeric micelle containing indomethacin.: II. Micelle formation and drug release behaviours*. J. Contr. Rel., **1998**, 51, 13-22.
- Kinget R., Kalala W., Vervoort L., and Mooter, G.U. *Colonic drug targeting*. J. Drug Target., **1998**, 6, 129-149.
- Kirsch P. *Modern fluoroorganic chemistry: synthesis, reactivity, applications*. Wiley-VCH, **2004**, 9-12.
- Kleessen B., Sykura B., Zunft HJ. and Blaut M. *Effects of inulin and lactose on fecal microflora, microbial activity, and bowel habit in elderly constipated persons*. Am. J. Clin. Nutr., **1997**, 65 (5) 1397-1402.
- Kohane D.S., Langer R. *Polymeric biomaterials in tissue engineering*. Pediatr. Res., **2008**, 63, 487–491.

- Krafft M.P., Giulieri F., Fontaine P., Goldmann M. *Reversible Stepwise Formation of Mono- and Bilayers of a Fluorocarbon/Hydrocarbon Diblock on Top of a Phospholipid Langmuir Monolayer. A Case of Vertical Phase Separation.* Langmuir, **2001**, 17, 6577-6584.
- Kruse, H.P., Kleessen, B., Blaut, M. *Effects of inulin on faecal bifidobacteria In human subjects.* Brit. J. Nutr., **1999**, 82, 375-382.
- Kwon G.S., Okano T. *Polymeric micelles as new drug carriers,* Adv. Drug Deliv. Rev., **1996**, 21, 107-116.
- La S.B., Okano T., Kataoka K. *Preparation and characterization of the micelle-forming polymeric drug indomethacin-incorporated poly(ethylene oxide)-poly(b-benzyl l-aspartate) block copolymer micelles.* J. Pharm. Sci., **1996**, 85, 85-90.
- Langer R., Peppas N.A. *Advances in biomaterials, drug delivery, and bionanotechnology.* Aiche J., **2003**, 49, 2990–3006.
- Lasic D.D. and Martin F. (Eds.). *Stealth Liposomes.* CRC Press, Boca Raton, **1995**.
- Lavasanifar A., Samuel J., Kwon G.S. *The effect of alkyl core structure on micellar properties of poly(ethylene oxide)-block-poly(L-aspartamide) derivatives.* Colloids Surf. B: Biointerfaces, **2001**, 22, 115-126.
- Law B. Weissleder R. Tung CH. *Peptide-based biomaterials for protease-enhanced drug delivery.* Biomacromolecules, **2006**, 7, 1261-1265.
- Li S. and Vert M., *Biodegradable polymers: Polyesters.* In A. Mathiowitz, ed., The Encyclopedia of controlled drug delivery, **1999**, 71-93, J. Wiley and Sons, New York, NY.

- Lin C.C., Metters A.T. *Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modelling*. Adv. Drug Deliv. Rev., **2006**, 58, 1379–1408.
- Lipinski C.A. *Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability*. J. Pharmacol. Toxicol. Methods **2000**, 44: 235-249.
- Lipinski C.A., Lombardo F., Dominy B.W., Feeney P. J. *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. Adv. Drug Deliv. Rev., **2001**, 46, 3-26.
- Liu, P. and Krishnan, T.R. *Alginate–pectin–poly-L-lysine particulate as a potential controlled release formulation*. J. Pharm. Pharmacol., **1999**, 51, 141–149.
- MacFarlane G.T., Cummings J.H., Gibson G.R. *Influence of retention time on degradation of pancreatic enzymes by colonic bacteria grown in 3-stage continuous culture system*. J. Appl. Bacteriol., **1989**, 67, 521-527.
- Maeda H., Wu J., Sawa T., Matsumura Y., Hori K. *Tumor vascular permeability and the epr effect in macromolecular therapeutics: a review*. J. Control. Release, **2000**, 65, 271-284.
- Mandracchia D., Palumbo Piccionello A., Pitarresi G., Pace A., Buscemi S., Giammona G. *Fluoropolymer Based on a Polyaspartamide containing 1,2,4-Oxadiazole Units: A Potential Artificial Oxygen (O<sub>2</sub>) Carrier*. Macromol. Biosci., **2007**, 7, 836–845.
- Mandracchia D., Pitarresi G., Palumbo F.S., Carlisi B., Giammona G. *pH-sensitive hydrogel based on a novel photocross-linkable copolymer*. Biomacromolecules, **2004**, 5, 1973-1982.

- Manfred P. Wirth, Oliver W. Hakenberg, Michael Froehner. *Antiandrogens in the Treatment of Prostate Cancer*. European Urology, **2007**, 51, 306–314.
- Maris B., Verheyden L., Reeth K.V., Samyn C., Augustijns P., Kinget R., Van den Mooter G. *Synthesis and characterisation of inulin-azo hydrogels designed for colon targeting*. Int J. Pharm., **2001**, 213, 143–152.
- Martini F.H., Timmons M.J., Tallitsch R.B. *Anatomia umana*. Edises, **2003**, 735, 807-808.
- Matsuoka K., Moroi Y. *Micellization of fluorinated amphiphiles*. Curr. Opin. Colloid and Interface Sci., **2003**, 8, 227-235.
- Mehvar R. *Dextrans for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents*. J. Control. Release, **2000**, 69, 1–25.
- Miyata T., Uragami T., Nakamae K. *Biomolecule sensitive hydrogels*. Adv Drug Deliv Rev, **2002**, 54, 79-98,
- Mooter G.V.d., Vervoort L., Kinget R. *Characterization of Methacrylated Inulin Hydrogels Designed for Colon Targeting: In Vitro Release of BSA*. Pharm Res., **2003**, 20, 303-307.
- Muller R.H., *Colloidal Carriers for Controlled Drug Delivery and Targeting: modification, characterization and in vivo distribution*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, Germany, and CRC Press, Boca Raton, FL, **1991**.
- Nah J.W., Jeong Y.I., Cho C.S. *Clonazepam release from core-shell type nanoparticles composed of poly( $\gamma$ -benzyl-L-glutamate) as the hydrophobic part and poly(ethylene oxide) as the hydrophilic part*. J. Polym. Sci. B Polym. Phys., **1998**, 36, 415-23.



- Nobuhiro N, Souichiro O, Horacio C, Masaki M, Yukio K, Yuichi S, et al. *Novel cisplatin-incorporated polymeric micelles can eradicate solid tumors in mice*. Cancer Res., **2003**, 63, 8977-8983.
- Okano T., Bae Y.H., Jacobs H., Kim S.W. *Thermally on-off switching polymers for drug permeation and release*. J. Controlled Release, **1990**, 11, 255-265.
- Omezzine A., Chater S., Mauduit C., Florin A., Tabone E., Chuzel F., Bars R., Benahmed M. *Long-term apoptotic cell death process with increased expression and activation of caspase-3 and -6 in adult rat germ cells exposed in utero to flutamide*. Endocrinology, **2003**, 144(2), 648-661.
- Orienti I., Cerchiara T., Luppi B., Bigucci F., Zuccari G., Zecchi V. *Influence of different chitosan salt on the release of sodium diclofenac in colon-specific delivery*. Int. J. Pharm., **2002**, 238, 51–59.
- Palumbo Piccionello A., Pace A., Buscemi S., Vivona N. *An ANRORC approach to the synthesis of perfluoroalkylated 1,2,4-triazole-carboxamides*. ARKIVOC vi, **2009**, 235-244.
- Park K., Park H. *Smart hydrogels*. Concise Polymeric Materials Encyclopedia. CRC Press, Boca Raton, **1999**, 1476-1478.
- Park S.Y., Bae Y.H. *Novel pH-sensitive polymers containing sulfonamide groups*. Macromol. Rapid Commun., **1999**, 20, 269-273.
- Patel V.R., Amiji M.M. *Preparation and characterization of freeze-dried chitosan-poly(ethylene oxide) hydrogels for site-specific antibiotic delivery in the stomach*. Pharm. Res., **1996**, 13, 588-593.
- Peppas N.A., Buresa P., Leobandunga W., Ichikawa H. *Hydrogels in pharmaceutical formulations*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, **2000**, 50, 27-46.

- Peppas N.A., Hilt J.Z., Khademhosseini A., Langer R. *Hydrogels in biology and medicine: from molecular principles to bionanotechnology*. Adv. Mater., **2006**, 18, 1345–1360.
- Pitarresi G., Palumbo F.S., Giammona G., Casadei M.A., Micheletti Moracci F. *Biodegradable hydrogels obtained by photocrosslinking of dextran and polyaspartamide derivatives*. Biomaterials, **2003**, 24, 4301-4313.
- Pitarresi, G., Tripodo, G., Calabrese, R., Craparo, E. F., Licciardi, M., Giammona, G. *Hydrogels for potential colon drug release by thiol-ene conjugate addition of a new inulin derivative*. Macromol. Biosci., **2008**, 8, 891–902 (A).
- Pitarresi G., Tripodo G., Cavallaro G., Palumbo F.S., Giammona G. *Inulin-iron complexes: A potential treatment of iron deficiency anaemia*. Eur. J. Pharm. Biopharm., **2008**, 68, 267-276, (B).
- Pitarresi G., Palumbo Piccionello A., Calabrese R., Pace A., Buscemi S., Giammona G. *Fluorinated derivatives of a polyaspartamide bearing polyethylene glycol chains as oxygen carriers*. J. Fluor. Chem., **2008**, 129, 1096-1103 (C).
- Price C. *Micelle formation by block copolymer in organic solvents*. Pure and Appl. Chem., **1983**, 55, 1563-1572.
- Prokop A. and Davidson J.M. *Nanovehicular intracellular delivery systems*. J Pharm Sci., **2008**, 97(9), 3518.
- Qiu Y., Park K. *Environment-sensitive hydrogels for drug delivery*. Adv. Drug Deliv. Rev., **2001**, 53, 321-339.
- Qui B., Stefanos S., Ma J., Lalloo A., Perry B.A., Leibowitz M.J., Sinko P.J., Stein S. *A hydrogel prepared by in situ cross-linking*

*of a thiol-containing poly( ethylene glycol)-based copolymer:a new biomaterial for protein drug delivery. Biomaterials, 2003, 24,11-18.*

- Ramaswamy M., Zhang X., Burt H.M., Wasan K.M. *Human plasma distribution of free paclitaxel and paclitaxel associated with diblock copolymers. J. Pharm. Sci., 1997, 86, 460.*
- Ratner B.D., Hoffman A.S. *Synthetic hydrogels for biomedical applications*, in: J.D. Andrade (Ed.). *Hydrogels for Medical and Related Applications*, ACS Symposium Series, 31. American Chemical Society, Washington, DC, **1976**, 1–36.
- Remesy C., Demigne C., Moran C. *Metabolism and utilization of short-chain fatty acids produced by colonic fermentation*. In Schweizer T.F., Edwards C.A., eds., *Dietary Fiber-A Component of Food Nutritional Function in Health and Disease*, London UK: Springer, **1992**, 137-150.
- Riess J.G. *Fluorinated vesicles. J. Drug Target., 1994, 2, 455-468.*
- Rubinstein A. *Microbially controlled drug delivery to the colon. Biopharm Drug Dispos., 1990, 11, 465-475.*
- Schiffelers R.M., Bakker-Woudenberg I.A., Snijders S.V., Storm G. *Localization of sterically stabilized liposomes in Klebsiella-pneumoniae infected rat lung tissue: influence of liposome characteristics. Biochim Biophys Acta, 1999, 1421, 329-339*
- Serres A., Baudys M., Kim SW. *Temperature and pH-sensitive polymers for human calcitonin delivery. Pharm. Res., 1996, 13, 196-201.*
- Seymour L.W., R. Duncan, J. Strohalm, J. Kopecek. *Effect of molecular weight (Mw) of N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide*

*copolymers on body distribution and rate of excretion after subcutaneous, intraperitoneal, and intravenous administration to rats.*

J. Biomed. Mater. Res., **1987**, 21, 1341-1358.

- Shinoda K., Hato M., Hayashi T. *The physiochemical properties of aqueous solutions of fluorinated surfactants.* J. Phys. Chem., **1972**, 76, 909-914.
- Siepmann J., Peppas N.A. *Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropylmethylcellulose (HPMC).* Adv. Drug Deliv. Rev., **2001**, 48, 139–157.
- Sinha VR., Kumria R. *Microbially triggered drug delivery to the colon.* Eur. J. Pharm. Sci., **2003**, 18, 3-18.
- Sudimack J., Lee RJ. *Targeted drug delivery via the folate receptors.* Adv. Drug Deliv. Rev., **2000**, 41, 147-162.
- Swift G. *Biodegradable polymers in the environment: are they really biodegradable.* Proc ACS Div Poly Mat Sci Eng, **1992**, 66, 403-404.
- Tian M., Qin A., Ramireddy C., Webber S.E., Munk P., Tuzar Z., Prochazka K. *Hybridization of block copolymer micelles.* Langmuir, **1993**, 9, 1741.
- Torchilin V. P. *Micellar Nanocarriers : Pharmaceutical Perspectives.* Pharm. Res., **2007**, 24, 1-16.
- Torchilin V. P., Trubetskoy V.S. *Which polymers can make nanoparticulate drug carriers long-circulating?* Adv. Drug Deliv. Rev., **1995**, 16, 141-155.
- Tripodo G., Pitarresi G., Palumbo F.S., Craparo E.F., Giammona G. *UV-photocrosslinking of inulin derivatives to produce*

*hydrogels for drug delivery application*. Macromol Biosci, **2005**, 5, 1074-1084.

- Trubetskoy V.S., Gazelle G.S., Wolf G.L., Torchilin V.P. *Polymeric Micelles as Targetable Pharmaceutical Carriers*. J. Drug Targeting, **1997**, 4, 381.
- Trubetskoy V.S., Torchilin V.P. *Use of polyoxyethylene-lipid conjugates as long-circulating carriers for delivery of therapeutic and diagnostic agents*. Adv. Drug Deliv. Rev., **1995**, 16, 311-320.
- Ulijn RV., Bibi N., Jayawarna V., Thornton PD., Todd SJ., Mart RJ., Smith AM., Gough JE. *Bioresponsive hydrogels*, **2007**, Mater Today, 10, 40-48.
- Van Loo J., Coussement P., De Leenheer L., Hoebregs H., Smits, G. *On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet*. Cri. Rev. Food. Sci. Nutr., **1995**, 36, 525–552.
- Vassallo M., Camilleri M., Phillip SF., Brow ML., Chapman NJ., Thomforde GM. *Transit through the proximal colon influences stool weight in the a irritable bowel syndrome*. Gastroenterology, **1992**, 102, 102-108.
- Wacker B.K., Scott E.A., Kaneda M.M., Alford S.K., Elbert D.L. *Delivery of sphingosine 1-phosphate from poly(ethyleneglycol) hydrogels*. Biomacromolecules, **2006**, 7, 1335-1343.
- Wang X. and Gibson G.R. *Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine*. J. Appl. Microbiol., **2008**, 75 (4), 373-380.
- Wang Y., Kaush C.M., Chun M., Quirk R.P., Mattice W.L. *Exchange of chains between micelles of labeled polystyrene-block-*

poly(oxyethylene) as monitored by non radiative energy transfer. *Macromolecules*, **1995**, 28, 904.

- Wang Y., Yu L., Han L., Sha X., Fang X. *Difunctional Pluronic copolymer micelles for paclitaxel delivery: synergistic effect of folate mediated targeting and Pluronic-mediated overcoming multidrug resistance in tumor cell lines*. *Int. J. Pharm.* **2007**, 337, 63-73.
- Wilhelm M., Zhao C.L., Wang Y., Xu R., Winnik M.A., Mura J.L., Riess G., Croucher M.D. *Poly(styrene-ethylene oxide) block copolymer micelle formation in water: a fluorescence probe study*. *Macromolecules*, **1991**, 24, 1033-1040.
- Wolever T., Spadafora P., Cunnane S., Pencharz P. *Propionate inhibits incorporation of colonic 1,2-13 CJ acetate into plasma lipids in humans*. *Am. J. Clin. Nutr.*, **1995**, 61, 1241-1247.
- Wuelfing W.P., Kosuda K., Templeton A.C., Harman A., Mowery M.D., Reed R.A. *Polysorbate 80 UV/vis spectral and cromatographic characteristic- defining boundary conditions for use of the surfactant in dissolution analysis*. *J. Of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2006**, 41, 774-782.
- Yamaoka T., Tabata Y., Ikada Y. *Distribution and tissue uptake of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice*. *J. Pharm Sci.*, **1994**, 83, 601-606.
- Yokoyama M., Miyauchi M., Yamada N., Okano T., Sakurai, Kataoka K., Inoue S. *Characterization and anti-cancer activity of micelle-forming polymeric anti-cancer drug*. *Cancer Res.*, **1990**, 50, 1693.

- Yu B.G., Okano T., Kataoka K., Kwon G. *Polymeric micelles for drug delivery: solubilization and haemolytic activity of amphotericin B*. J. Control. Rel., **1998**, 53, 131-136.
- Zhang<sup>1</sup> M., Latham<sup>1</sup> D.E., Delaney<sup>1</sup> M.A., Chakravarti A. *Survivin mediates resistance to antiandrogen therapy in prostate cancer*. Oncogene, **2005**, 24, 2474–2482.